

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Markéta Vegrachtová

Příprava transgenní kultury testikulárních kmenových buněk *Xenopus tropicalis*.

Preparation of *Xenopus tropicalis* transgenic testicular stem cell culture.

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Tereza Tlapáková, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 08. 2014

Podpis

Poděkování

Poděkování patří především mé školitelce **RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D.** za odborné vedení, hodnotné rady, ochotu a nevýslovnou trpělivost. Ráda bych také poděkovala Ing. RNDr. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. za pomoc i odborné rady. Dále děkuji Mgr. Monice Flachsové, Mgr. Heleně Fuxové, Mgr. Andree Mančíkové, Mgr. Alešovi Petelákovi, Mgr. Evě Seifertové, Janě Dvořákové, RNDr. Haně Španielové, Ph.D., Mgr. Jiřině Suchanové, Bc. Monice Bláhové, Bc. Karolíně Strnadové, Tereze Kratochvílové, Zdeňku Cimburkovi a všem členům kolektivu za příjemné pracovní prostředí, přátelskou atmosféru a pomoc. Děkuji rodině a přátelům, jmenovitě Bc. Adéle Krapkové a Marku Soldátovi za pomoc, podporu i trpělivost.

Abstrakt

Testikulární kmenové buňky (TSCs) představují relativně dostupný zdroj potencionálně pluripotentních buněk, které jsou významné zejména pro své uplatnění v regenerativní medicíně. Pro studium migračního a diferenciačního potenciálu kmenových buněk je vhodným modelovým organismem *Xenopus tropicalis*. Tento obojživelník se vyznačuje vnějším oplozením a embryonálním vývojem značného množství zárodků v rámci jedné snůšky. Oocyty a embrya jsou dostatečně velká (kolem 1 mm) a tím i vhodná pro mikromanipulační zásahy. Laboratoř vývojové biologie PřF UK uspěla v založení smíšené buněčné kultury TSCs rostoucích na podkladové vrstvě pre-Sertoliho buněk. Tato kultura byla odvozena z varlat juvenilního samce *X. tropicalis*. V rámci studia jejich diferenciačního potenciálu bylo zjištěno, že rozhodujícím faktorem umožňujícím rychlou proliferaci kmenových buněk a jejich formování do charakteristických kolonií je leukemický inhibiční faktor (LIF). Tento protein je produkován oběma typy buněk přítomných v kultuře. Stejný pozitivní vliv na proliferační potenciál kmenových buněk má i myší LIF, což ukazuje na evoluční konzervovanost metabolických drah souvisejících s udržením kmenového charakteru. RT-PCR analýza dále odhalila téměř identický expresní profil u TSCs a podkladových pre-Sertoliho buněk. Na základě těchto výsledků lze uvažovat o jejich společném původu a vysoce pravděpodobném pluripotentním charakteru TSCs, který je třeba dále demonstrovat diferenciací *in vitro* a *in vivo*. TSCs kultivované metodou zavěšené kapky se spontánně transformují do buněk neurálního charakteru a dříve provedené experimenty odhalily schopnost transplantovaných vitálně barvených TSCs migrovat do orgánů všech tří zárodečných listů. Pro transplantační experimenty umožňující dlouhodobě sledovat osud vnesených buněk, popř. jejich vertikální přenos do další generace, jsem metodou nukleofekce připravila stabilní transgenní kulturu TSCs *Xenopus tropicalis* exprimující Katushka RFP pod CAG promotorem. Pilotní mikroinjekce transgenních TSCs do peritonea pulců potvrdily jejich široký migrační potenciál.

Klíčová slova: Testikulární kmenové buňky, *Xenopus tropicalis*, LIF, transfekce, diferenciacie, expresní profil

Abstract

Testicular stem cells (TSCs) are relatively accessible potential source of pluripotent cells, which are particularly important for their application in regenerative medicine. *Xenopus tropicalis* is a useful model organism to study the migration and differentiation potential of stem cells. This amphibian is characteristic by outer fecundation and embryonic development of a great amount of embryos after fertilization. Oocytes and embryos are large enough (about 1 mm) to be suitable for micromanipulation micromanipulations. Laboratory of Developmental Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague succeeded in the establishment of a mixed cell culture of TSCs growing on feeder layer of pre-Sertoli cells. This culture was derived from the testes of juvenile *Xenopus tropicalis* male. In the study of their differentiation potential it was found, that leukemia inhibitory factor (LIF) is the decisive factor allowing rapid proliferation of stem cells and their forming into characteristic colonies. This protein is produced by both types of cells which are present in the culture. The mouse LIF has the same positive effect on the proliferative potential of stem cells, which points at the evolutionary conservation of metabolic pathways associated with the maintenance of the stemness. RT-PCR analysis revealed an almost identical expression profile of TSCs and pre-Sertoli cell feeder layer. Based on these results their common origin and highly probable pluripotent nature of TSCs may be considered, which requires further demonstration by differentiation *in vitro* and *in vivo*. TSCs cultivated by Hanging drop method spontaneously transformed into cells of neural character. Previous experiments revealed the ability of transplanted vitally stained TSCs migrate into organs of all three germ layers. For transplantation experiments allowing long-term observation of the fate of introduced cells, or eventually their vertical transmission to the next generation, I prepared a stable transgenic *Xenopus tropicalis* TSC culture using nucleofection method, expressing Katushka RFP under the CAG promoter. Pilot microinjections of transgenic TSCs into tadpoles' peritoneum confirmed their broad migration potential.

Key words: Testicular stem cells, *Xenopus tropicalis*, LIF transfection, differentiation, expression profile

OBSAH

1	Seznam zkratk	1
2	Úvod	3
3	Cíle práce	4
4	Literární přehled	4
4.1	<i>Xenopus tropicalis</i>	4
4.2	Testikulární kmenové buňky	6
4.2.1	Charakteristiky kmenových buněk	6
4.2.2	Kmenové buňky zárodečné linie	7
4.2.3	Somatické buňky varlat	14
5.1	Živý materiál	21
5.1.1	Pokusná zvířata	21
5.1.2	Buněčné kultury	22
5.2	Kultivační a transfekční média	22
5.3	Materiál pro transfekci	23
5.3.1	Plazmid	23
5.3.2	Lipofekční činidla	23
5.3.3	Transfekční roztoky	24
5.4	Analýza DNA	24
5.4.1	PCR	24
5.4.2	Primery	25
5.4.3	Restrikční endonukleázy	25
5.4.4	Sady chemikálií	26
5.5	Roztoky pro IVF a transplantace	26
5.6	Další roztoky	26
5.7	Barvení buněk a protilátky	26

5.8	Chemikálie a ostatní materiál.....	27
5.9	Přístroje	27
6	Metody.....	28
6.1	RT-PCR	28
6.2	Amplifikace plazmidového vektoru	29
6.3	Restrikční reakce	30
6.4	Kultivace smíšené buněčné kultury.....	30
6.4.1	Vliv LIF v médiu	31
6.4.2	Příprava jednobuněčné suspenze TSCs	31
6.5	Transfekce buněčné kultury plazmidovou DNA	31
6.5.1	Lipofekce.....	31
6.5.2	Kalcium fosfátová metoda.....	33
6.5.3	Nukleofekce	33
6.6	FACS.....	34
6.6.1	Příprava buněk pro FACS	34
6.7	Detekce alkalické fosfatázy	35
6.8	Metoda zavěšené kapky	35
6.8.1	Příprava kultury metodou zavěšené kapky	35
6.8.2	Imunohistochemické barvení	36
6.9	IVF	37
6.10	Transplantace TSC.....	37
7	Výsledky	38
7.1	Charakterizace kultury TSCs	38
7.1.1	Efekt LIF na proliferační potenciál TSCs	38
7.1.2	RT-PCR	39
7.2	Transfekce	41

7.2.1	Lipofekce.....	41
7.2.2	Kalcium fosfátová metoda.....	42
7.2.3	Nukleofekce	43
7.2.4	FACS	44
7.3	Detekce alkalické fosfatázy	46
7.4	Metoda zavěšené kapky	46
7.5	Transplantace TSC	48
8	Diskuze	49
9	Závěr	55
10	Seznam literatury	56

1 SEZNAM ZKRATEK

A _{al}	A _{aligned}
A _{pr}	A _{paired}
A _s	A _{single}
bFGF	basic fibroblast growth factor
BFM	bromfenolová modř
BMP	bone morphogenetic protein
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dpc	days post coitum
ECCs	embryonic carcinoma cells
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGCs	embryonic germ cells
EGF	epidermal growth factor
eSC	embryonal sertoli cell
ESCs	embryonic stem cells
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FSH	follicle-stimulating hormone
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
gPS	germline-derived pluripotent stem cells
GSCs	germline stem cells
haGSCs	human adult GSCs
HBS	hepes buffered saline
hCG	human chorionic gonadotropin
HEPES	4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid

HSCs	hematopoietic stem cells
iNSCs	induced neural stem cells
iPS cell	induced pluripotent stem cell
IVF	<i>in vitro</i> fertilisation
LIF	leukemia inhibitory factor
maGSCs	multipotent adult germline stem cells
METRO	message transport organizer
mGS	cells multipotent germline stem cells
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSCs	mesenchymal stem cells
NSCs	neural stem cells
PBS	phosphate buffered saline
pDNA	plasmid deoxyribonucleic acid
PGCs	primordial germ cells
RFP	red fluorescent protein
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SCF	stem cell factor
SCO	Sertoli cell only
SLCs	stem Leydig cells
SSCs	spermatogonial stem cells
TBE	tris-borate-EDTA pufr
TE	tris-EDTA
TSCs	testicular stem cells

2 ÚVOD

Kmenové buňky jsou v současné době intenzivně studované téma vývojové biologie. Díky schopnosti sebeobnovy a diferenciaci mají rozsáhlý terapeutický potenciál. Nejzajímavější jsou z tohoto hlediska pluripotentní kmenové buňky, které mohou diferencovat do různých typů tkání odvozených ze všech tří zárodečných listů. Jedním ze zdrojů pluripotentních buněk je testikulární tkáň. Oproti embryonálním kmenovým buňkám jsou testikulární kmenové buňky dostupné bez etických obtíží a lze je izolovat i z dospělých jedinců (Guan et al., 2006; Conrad et al., 2008), čímž odpadají možné imunologické komplikace v případě terapeutického použití. Zároveň se jejich konverze do pluripotentního stádia obejde bez složité reprogramace jako je tomu u indukovaných pluripotentních buněk. Studium pluripotence kmenových buněk zahrnuje *in vitro* diferenciaci a také transplantační *in vivo* studie, které kromě sledování diferenciačního a migračního potenciálu představují způsob přípravy transgenních jedinců.

Přestože se výzkum kmenových buněk většinou omezuje především na savčí modelové organismy, pro transplantační studie je výhodnější například žába drápatka tropická (*Xenopus tropicalis*). Nespornou výhodou tohoto organismu je vnější oplození a embryonální vývoj, kmenové buňky tak lze sledovat v kterékoliv fázi vývoje. Další předností je i možnost u samic hormonálně indukovat ovulaci kdykoliv během roku a získat tak relativně vysoký počet oocytů, které jsou dostatečně velké pro mikromanipulační experimenty. Zároveň je *Xenopus tropicalis* dostatečně podobný člověku včetně diploidního genomu (Kashiwagi et al., 2010).

V Laboratoři vývojové biologie Přf UK se podařilo založit kulturu kmenových buněk z varlat juvenilního jedince *Xenopus tropicalis*. Kmenové buňky s pozitivní reakcí na přítomnost alkalické fosfatázy prosperují na podpůrné vrstvě pre-Sertoliho buněk a vytvářejí kolonie charakteristické pro kmenové buňky. Tyto testikulární kmenové buňky mají široký migrační potenciál a uvažuje se i o jejich pluripotentním potenciálu.

3 CÍLE PRÁCE

- Optimalizace kultivačních podmínek stabilní linie testikulárních kmenových buněk odvozených z varlat *Xenopus tropicalis*.
- Analýza expresního profilu pre-Sertoliho buněk a testikulárních kmenových buněk v rámci založené buněčné linie.
- Příprava stabilní transgenní linie testikulárních kmenových buněk exprimujících Katushka červený fluorescenční protein.
- Studium migračního potenciálu transgenních testikulárních kmenových buněk po allogenní transplantaci do peritonea pulců ve stádiu 41.

4 LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 *Xenopus tropicalis*

Xenopus tropicalis neboli Drápatka tropická (Obr. 1) je druh africké drápkaté žáby, která je jedním z modelových organismů vývojové biologie a embryologie obratlovců, buněčné a molekulární biologie, genomiky, neurobiologie i toxikologie. Zejména jako modelový organismus vývojové biologie má zásadní vlastnosti, kterými disponují pouze obojživelníci. Pomocí hormonálně řízené ovulace lze kdykoliv během roku získat relativně velká vajíčka, u nichž po oplození probíhá embryogeneze *ex vivo* a jednotlivá stadia jsou tudíž snadno pozorovatelná. Na robustní embrya lze navíc působit různými činidly, injikovat do nich rozličné látky (např. nukleové kyseliny, proteiny nebo celá jádra) či provádět jiné chirurgické úkony a transplantace. Zároveň jsou obojživelníci dostatečně podobní člověku na to, aby mohli fungovat jako model pro některé druhy nemocí (Kashiwagi et al., 2010).



Obrázek 1 *Xenopus tropicalis* – kmen Nigerian z chovu Přírodovědecké fakulty.

Od roku 1950 byl v biologii jako modelový organismus používán druh *Xenopus laevis* (Drápatka vodní), který sehrál klíčovou roli v identifikaci mechanismů časného embryonálního vývoje, určení základního tělesného plánu obratlovců a časně organogeneze. Fylogeneticky patří do rodu *Xenopus*, třídy *Amphibia* (Obojživelníci), podtřídy *Ecaudata* (Bezocasí), řádu *Anura* (žáby), čeledi *Pipidea* a podčeledi *Xenopodinae* (Cannatella and de Sa, 1993). Rod *Xenopus* se dále rozděluje na dvě větve: *Xenopus*, která zahrnuje právě i *Xenopus laevis*, zatímco *Xenopus tropicalis* se řadí do větve *Silurana* (Evans et al., 2004).

X. tropicalis má ovšem ve srovnání s druhem *X. laevis* několik výhod. V první řadě má menší genom. Dále pak je jeho karyotyp složený z 20 chromozomů ($2n$) a je to tedy jediný diploidní druh tohoto rodu (Beck and Slack, 2001). Genom o velikosti $1,7 \times 10^9$ patří zároveň mezi nejmenší u obojživelníků (Thiebaud and Fischberg, 1977). *X. tropicalis* má také kratší generační dobu, samečci dosahují pohlavní zralosti někdy mezi 4 – 5 měsícem věku, u samic je to 4 – 6 měsíců (Grammer et al., 2005). To je užitečné zejména pro výzkum funkcí genů během časného embryonálního vývoje pomocí antisense morpholino oligonukleotidů nebo pro mutační analýzy. Další nespornou výhodou druhu *X. tropicalis* je, že byl sekvenován celý jeho genom a výsledky jsou nyní dostupné na internetových stránkách Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4.home.html>). Vzhledem

k blízké příbuznosti obou druhů je také možné využívat experimentální techniky a protokoly navržené pro *X. laevis* (Kashiwagi et al., 2010).

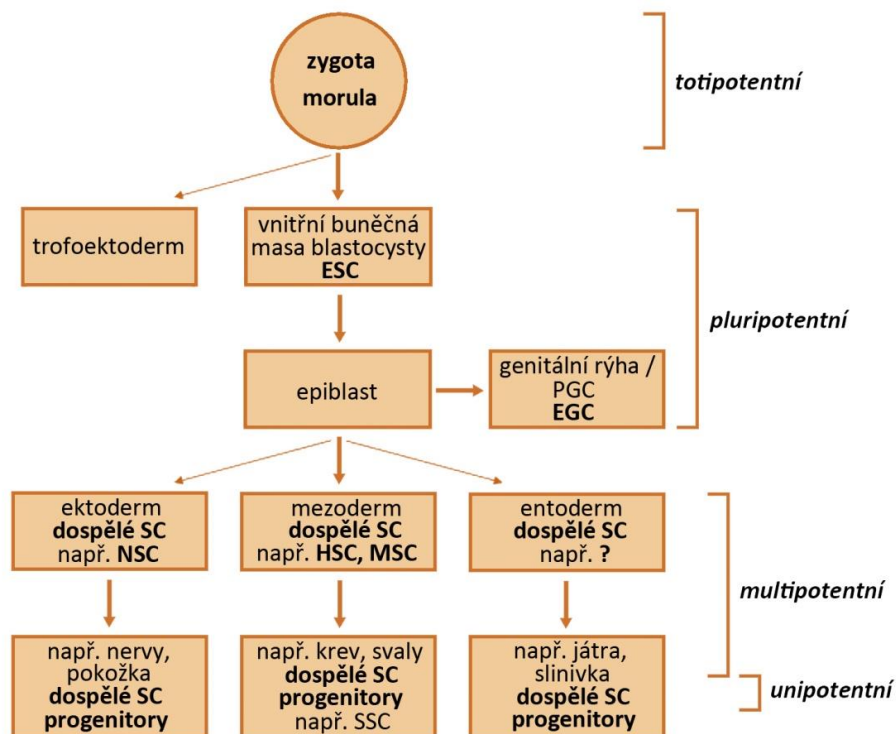
Vnější oplození u *X. tropicalis* spojené s tisíci oocyty ve snůšce, jejichž vývoj lze synchronizovat pomocí umělého oplození, se dá dobře využít pro studium migračního a diferenciačního potenciálu kmenových buněk *in vivo*.

4.2 Testikulární kmenové buňky

Testikulární kmenové buňky jsou nediferencované buňky, které pochází z testikulární tkáně. Ve varlatech existují, jak somatické kmenové buňky, tak kmenové buňky zárodečné linie (Liu et al., 2009).

4.2.1 Charakteristiky kmenových buněk

Hlavními vlastnostmi kmenových buněk je jejich schopnost sebeobnovy a diferenciace. Podle jejich diferenciačního potenciálu je pak můžeme rozdělovat na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní (Obr. 2).



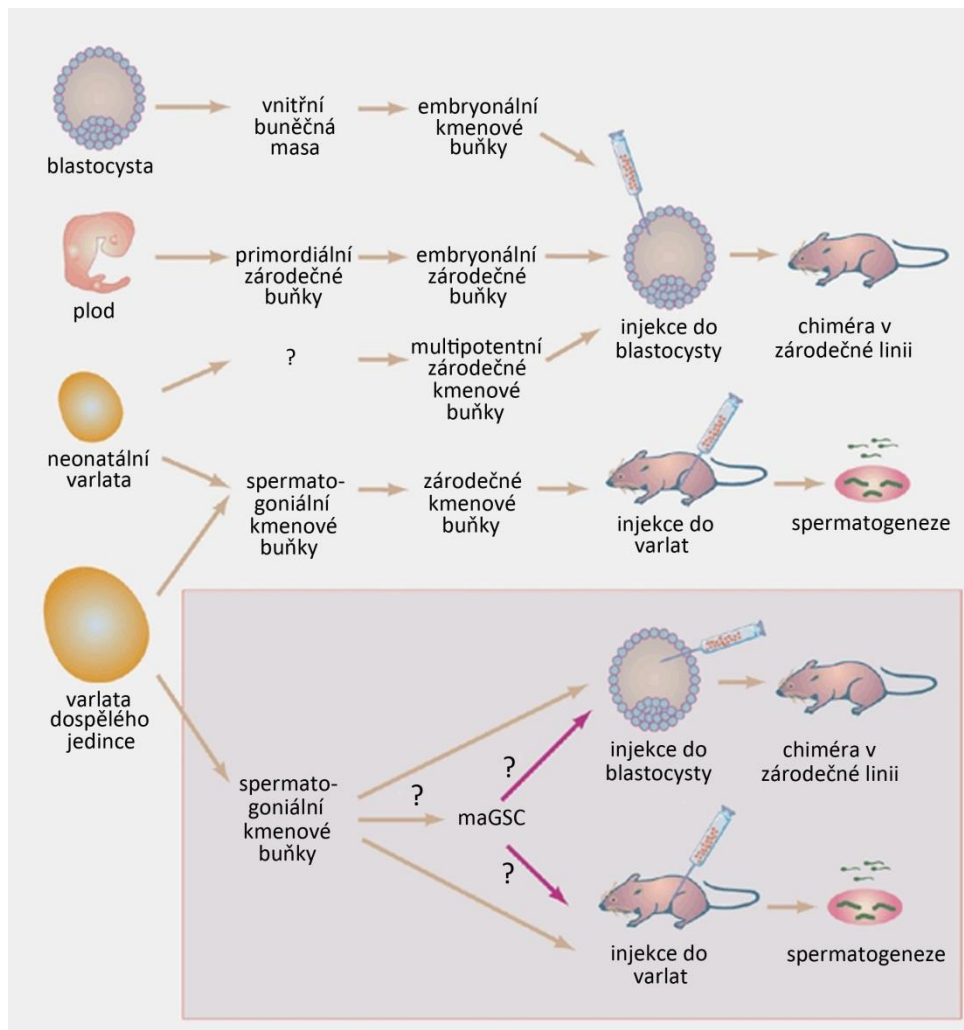
Obrázek 2 Diferenciační potenciál kmenových buněk. ESC – embryonální kmenové buňky; EGC – embryonální zárodečné buňky; SC – kmenové buňky; NSC – neurální kmenové buňky; HSC – hematopoetické kmenové buňky; MSC – mezenchymální kmenové buňky; SSC – spermatogoniální kmenové buňky (převzato a upraveno podle Becker C a Jakse G, 2007).

Totipotentní buňky mohou diferencovat do všech buněčných typů včetně extraembryonálních tkání. Do této kategorie se tedy řadí zygota a buňky časného embrya (do stádia moruly). Pluripotentní je vnitřní buněčná masa embrya, ze které mohou vzniknout buňky všech tří zárodečných listů kromě extraembryonálních tkání. Izolované a kultivované buňky vnitřní buněčné masy se nazývají embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells; ESCs). Multipotentní kmenové buňky jsou kmenové buňky nacházející se ve tkáni dospělého jedince a diferencují pouze do buněk dané buněčné linie, příkladem jsou hematopoetické kmenové buňky (hematopoietic stem cells; HSCs) nebo neurální kmenové buňky (neural stem cells; NSCs). Unipotentní neboli progenitorové kmenové buňky diferencují na jediný buněčný typ a jsou to například spermatogoniální kmenové buňky (spermatogonial stem cells; SSCs).

Morfologicky jsou kmenové buňky relativně malé s velkým poměrem jaderného objemu vůči cytoplazmatickému. Pro každý typ kmenových buněk existují typické povrchové markery či expresní profil, nicméně jediný nezpochybnitelný způsob jejich identifikace je cílená diferenciace. Studie kmenových buněk *in vivo* jsou nejčastěji prováděny na myších či hlodavcích obecně, u nichž jsou k dispozici knock-out technologie či postupy pro vytvoření indukovaných pluripotentních buněk. Dalším používaným organismem je také prase díky své podobnosti s člověkem a nakonec člověk, kde je výzkum mnohdy spojený s klinickými studiemi. Informace o buňkách pohlavních orgánů a jejich kultivaci se v následujícím textu budou týkat těchto modelových organismů.

4.2.2 Kmenové buňky zárodečné linie

Zárodečné buňky jsou původem z primordiálních zárodečných buněk, které migrují v časném embryonálním vývoji do oblasti budoucích gonád, kde se diferencují podle pohlaví jedince na spermatogonie nebo oogonie. Z těchto buněk dále procesem gametogeneze vznikají spermie resp. oocyty. Zárodečné kmenové buňky pak lze experimentálně izolovat a kultivovat v různých fázích ontogeneze. Získané buněčné linie se liší, jak názvem, tak diferenciačním potenciálem (Obr. 3).



Obrázek 3 Potenciál kmenových buněk odvozených od zárodečné linie. Embryonální kmenové buňky jsou odvozeny z vnitřní buněčné masy. Embryonální zárodečné buňky jsou odvozeny od primordiálních zárodečných buněk plodu. Z neonatálních varlat mohou být odvozeny jak unipotentní, tak multipotentní zárodečné kmenové buňky. Po injekci do blastocysty embryonální kmenové buňky, embryonální zárodečné buňky a multipotentní zárodečné kmenové buňky tvoří chiméry. Zárodečné kmenové buňky zase po injekci do varlat produkují spermie, ale ne chiméry nebo teratomy. SSCs izolované z dospělé tkáně jsou schopné obojího a mohou z nich vzniknout multipotentní zárodečné kmenové buňky, které mohou diferencovat do různých buněčných typů *in vitro* i *in vivo* (převzato a upraveno podle Kanatsu-Shinohara and Shinohara, 2006).

4.2.2.1 Primordiální zárodečné buňky

Primordiální zárodečné buňky jsou prekursori zárodečných buněk, ze kterých vznikají gamety a jsou tak jediným typem buněk schopných přenosu genetické informace do dalších generací. U obratlovců dochází k oddělení buněk zárodečné linie od ostatních na počátku embryonálního vývoje a poté PGC migrují do oblasti genitálních rýh. Během migrace dochází k masivní proliferaci a po dosažení genitálních rýh, budoucích gonád, je zahájena pohlavní diferenciací.

PGC mohou být determinovány buď autonomně na základě obsahu zárodečné plazmy, nebo indukčními signály okolních buněk. Způsob specifikace germinální linie zárodečnou plazmou nalezneme mimo jiné právě u žab rodu *Xenopus*.

Zárodečná plazma je oblast cytoplazmy oocyty, konkrétně je částí oblasti METRO (message transport organiser) mitochondriálního mraku. Obsahuje germinální granula, mitochondriální rRNA a různé kódující a nekódující RNA, které zahrnují např. geny Xcat2, Xlirts, Xdazl, DEADSouth, Xpat, Xwnt11. Germinální granula mají dynamickou 3D strukturu, která se mění během oogeneze a vývoje (Kloc et al., 2002). V neoplozeném oocyty se zárodečná plazma nachází v kortikální oblasti v podobě cytoplazmatických ostrůvků. Po oplození je zahájena kortikální rotace, kdy tyto ostrůvky agregují a migrují na vegetální pól oocyty. Pro tento pohyb je zásadní mikrotubulární cytoskelet. Prouděním cytoplazmy jsou pak vzniklé shluky přesunuty do vnitřní části oocyty. Nakonec je zárodečná plazma zachycena dělicím vřeténkem (Ressom and Dixon, 1988). Od stádia 8 buněk rýhujícího se embrya je zárodečná plazma obsažena pouze ve vegetálních blastomerách. Vznikající PGC pak postupně migrují mezi buňkami entodermální buněčné masy a z posteriorní oblasti embryonálního střeva dál přes dorzální mezenterium do genitálních rýh. Množství PGC se násobí zhruba 4x během stádií 12 – 46 buněk a ve stádiu 46 už téměř všechny dosáhnou genitálních rýh a je zahájena diferenciace PGCs na zárodečné kmenové buňky (Kamimura et al., 1976).

U savců jsou PGCs indukovány signály z okolních buněk. U myši vznikají PGCs v proximálním epiblastu v blízkosti extraembryonálního ektodermu. Pro jejich indukci jsou například nezbytné faktory BMP4 a BMP8b, které jsou produkovány extraembryonálním ektodermem (Ying et al., 2000; Yoshimizu et al., 2001; Ohinata et al., 2009). Populaci PGCs lze detekovat již v sedmidenním embryu, tzn. 7,5 – 8,5 dne po oplození (day post coitum; dpc) je nalezneme na bázi alantoisu v extraembryonálním mezodermu. V období 9 – 10,5 dpc se v rámci invaginace dostávají do stěny trávicího traktu embrya a migrují přes mezenchym dorzálního mezenteria. Oblasti genitálních rýh dosáhne většina PGCs v období do 11,5 dpc (Gomperts et al. 1994; McLaren, 2003; De Felici et al. 2009). Během migrace

dochází k proliferaci těchto buněk a jejich počet se zhruba 200x znásobí (Tam and Snow 1981).

Primární kulturu PGCs se podařilo založit z proximální části epiblastu embrya starého 6 dpc (Yoshimizu et al., 2001). V rámci signalizace během proliferace a diferenciace je u PGCs zásadní exprese genu pro receptorovou tyrozin kinázu (c-kit) a jejího ligandu (kitlg) neboli faktoru kmenových buněk (stem cell factor; SCF), jehož exprese je zajišťována Sertoliho buňkami (Rossi et al., 2000). Pokud je SCF přidán do kultivačního média, podporuje proliferaci PGCs a brání jejich apoptóze. Tímto způsobem působí také leukemický inhibiční faktor (leukemia inhibitory factor; LIF), který navíc podporuje přeměnu těchto buněk do pluripotentního stádia (Pesce et al., 1993; Hiroyuki et al., 2011).

PGCs a dokonce i buňky epiblastu mohou po transplantaci do sterilního samce myši osídlit semenotvorné kanálky varlat a vytvořit kolonie buněk, u nichž probíhá spermatogeneze. Kromě toho bylo dokázáno, že po mikroinseminaci samice spermiemi odvozených od PGCs izolovaných 8,5 dpc, vznikají normální fertilní potomci. Použití juvenilních myší jako příjemců se ukázalo při experimentech jako zásadní, což může mít dva důvody: buď musí být Sertoliho buňky nematurované, a tedy bez těsných spojů, nebo nematurovaná varlata produkují faktory podporující přežití a diferenciaci. Analýza metylace genů *Igf2r* a *H19* u kultivovaných buněk neodhalila žádné abnormality u epigenetických modifikací, konkrétně imprintingu (Chuma et al., 2005).

4.2.2.2 Embryonální zárodečné buňky

PGCs lze dlouhodobě kultivovat *in vitro* přeměnou na buňky podobné ESCs (ESC-like cells). PGCs se ESCs podobají svým diferenciačním potenciálem, totipotence PGCs je však na rozdíl od pluripotence ESC potlačena a projevuje se až po oplození. Pokud jsou PGCs kultivovány v přítomnosti bazického fibroblastového růstového faktoru (bFGF, basic fibroblast growth factor), LIF a membránového a rozpustného SCF, vzniká dlouhodobá proliferující kultura těchto buněk. U takto kultivovaných PGCs neustává proliferace ani v době, kdy by se přestaly dělit *in vivo*. Vzhledem k tomu, že v kultuře tvoří kolonie a připomínají nediferencované pluripotentní embryonální kmenové buňky (ESC), jsou označovány jako embryonální

zárodečné buňky (embryonic germ cells, EGCs). Jejich vlastnosti byly potvrzeny, jak expresí genů charakteristických pro kmenové buňky, tak schopností diferencovat do různých buněčných typů *in vitro* a *in vivo* (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992).

4.2.2.3 Embryonální nádorové buňky

Transformací PGCs *in vivo* vznikají embryonální nádorové buňky (embryonal carcinoma cells; ECCs). Ve chvíli, kdy opustí semenotvorné kanálky varlat, vytváří testikulární teratomy, což jsou nádory obsahující deriváty všech tří zárodečných listů (Donovan and de Miguel, 2003). Z izolovaných ECCs byla odvozena stabilní linie s názvem P19. Kultivované ECCs si zachovávají svůj pluripotentní potenciál a působením různých faktorů lze indukovat jejich diferenciaci. Působení kyseliny retinové vyústí v diferenciaci ECCs do neuronů, mikroglií a astroglíí, kdežto po přidání dimetylsulfoxidu dochází k diferenciaci buněk do endodermálních a mezodermálních derivátů včetně srdeční a hladké svaloviny (McBurney, 1993).

4.2.2.4 Spermatogoniální kmenové buňky

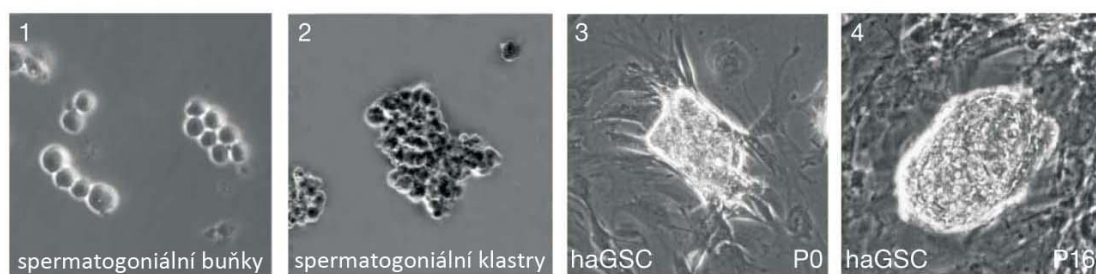
SSCs tvoří konstantní sebeobnovující se populaci buněk zárodečné linie, které jsou zodpovědné za udržování stálého počtu spermatogonií pro spermatogenezi. Tyto buňky se diferencují z PGCs v semenotvorných kanálkách, kde se nacházejí na bazální membráně semenotvorného epitelu obklopené Sertoliho buňkami. Postupně diferencují a prolifерují, přičemž vytváří klastry spermatogonií, které jsou navzájem propojeny cytoplazmatickými můstky (Kanatsu-Shinohara and Shinohara, 2013).

Provedené morfologické studie rozlišují spermatogonie na typ A, přechodný typ a typ B. Spermatogonie typu A jsou nejméně diferencované a dále se dělí na jednotlivé ($A_{\text{single}} - A_s$), párové ($A_{\text{paired}} - A_{\text{pr}}$) a řetězené ($A_{\text{aligned}} - A_{\text{al}}$). A_s jsou pravděpodobně funkční kmenové buňky (tedy SSCs), A_{pr} jsou vždy po dvou spojeny cytoplazmatickými můstky, dále se dělí a vytváří řetězce spermatogonií typu A_{al} . Celý řetězec se pak současně mění na spermatogonie typu A_1 a začíná zrání spermatogonií (Huckins, 1971 podle Goossens and Tournaye, 2006). Pro primáty a některé jiné savce byly navrženy mírně odlišné modely spermatogeneze: A0/A1 a Ap/Ad model (Goossens and Tournaye, 2006).

Primární kultura SSCs přežívá v *in vitro* podmínkách zhruba týden. Až roku 2003 se podařilo založit dlouhodobou proliferující kulturu SSCs bez použití metody virové nebo jiné transfekce. Kultivační médium bylo obohaceno o neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk (glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF), epidermální růstový faktor (epidermal growth factor; EGF), bFGF, LIF a jako podpůrné buňky byly použity myší embryonální fibroblasty. Takto kultivované buňky byly označeny jako zárodečné kmenové buňky (germline stem cells; GSCs). GSCs odvozené od SSCs se však na rozdíl od EGCs odvozených od PGCs mohou diferencovat pouze do buněk zárodečné linie a netvoří tedy teratomy. Jejich výhodou však je, že mohou být izolovány postnatálně, dokonce i z dospělého jedince. Mimoto byly úspěšně použity i pro transplantační experimenty, během nichž došlo k obnovení plodnosti u sterilní myši. Pomocí transgenních SSCs byly tímto způsobem také vytvořeny transgenní myši (Kanatsu-Shinohara et al., 2003). O rok později se dokonce podařilo z varlat neonatální myši založit kulturu multipotentních ESC-like buněk, které byly nazvány multipotentní zárodečné kmenové buňky (multipotent germline stem cells; mGS cells). Jejich kultivace probíhala za podobných podmínek jako u GSCs a navíc vytvářely kolonie nerozeznatelné od kolonií ESCs. Tyto buňky po transplantaci do podkoží myši tvořily teratomy a po jejich transplantaci do blastocysty vznikly chiméry v zárodečné linii (Kanatsu-Shinohara et al., 2004). Zajímavé je, že u těchto buněk probíhá exprese některých faktorů (Pou5f1, Sox2, Myc a Klf4) typických a nezbytných pro reprogramování fibroblastů do pluripotentního stavu, což svědčí o potenciálu těchto buněk pro přeměnu do pluripotentního stádia (Kanatsu-Shinohara et al., 2008). Toho se povedlo docílit u buněk izolovaných z dospělé myši a buňky byly označeny jako multipotentní kmenové buňky zárodečné linie dospělce (multipotent adult germline stem cells; maGSCs). Pluripotence těchto buněk byla dokázána hned několika způsoby. Diferenciace *in vitro* byla u maGSCs indukována metodou zavěšené kapky (Hanging Drop method) a výsledkem pak byly deriváty všech tří zárodečných listů. *In vivo* experimenty potvrdily pluripotentní stav maGSCs tím, že se po jejich transplantaci do imunodeficientní myši vytvářely teratomy. Po injekci do blastocysty se tyto buňky integrovaly v rámci různých orgánů včetně varlat a došlo i k přenosu do další generace (Guan et al., 2006). Podle Ko et al. (2009) však v tomto případě

není jistý zárodečný původ použitých buněk. Naopak tento kolektiv autorů publikoval odlišný postup na indukci pluripotence u unipotentní maturované zárodečné buňky, kterou označily jako pluripotentní kmenová buňka odvozená ze zárodečné linie (germline-derived pluripotent stem cells; gPS). Pluripotence byla standardně potvrzena diferenciací *in vitro* i *in vivo* (Ko et al., 2009).

V roce 2008 se také podařilo získat pluripotentní buňky z varlat dospělého muže. Tak zvané GSCs z dospělého člověka (human adult GSCs; haGSCs) byly odvozeny ze spermatogoniálních buněk pod vlivem LIF. Buňky, které byly odebrány při biopsii, ztrácely v průběhu kultivace znaky typické pro spermatogoniální buňky a získaly vlastnosti a expresní profil podobný ESCs (Obr. 4). Pluripotence byla dokázána diferenciací *in vitro* a tvorbou teratomů v imunodeficientní myši (Conrad et al., 2008).



Obrázek 4 Vytvoření haGSCs z SSCs dospělého muže. 1: SSCs; 2: prolifерující kolonie SSCs; 3: vzniklé klastry haGSCs; 4: klastry haGSCs po 16 pasážích. haGSCs - human adult GSCs, zárodečné kmenové buňky z dospělého člověka; P0 – pasáž 0; P16 – 16. pasáž (převzato a upraveno podle Conrad et al., 2008)

Spermatogonie je také možné získat diferenciací gonocytů *in vitro* v médiu s LIF. V tomto případě není LIF nutný pro sebeobnovu, ale je důležitý pro přežití gonocytů a jejich maturaci. Zároveň bylo zjištěno, že SSCs mohou být kultivovány bez podpůrných buněk nebo dokonce v suspenzi (Kanatsu-Shinohara et al., 2005; 2006; 2007).

SSCs jsou lákavým zdrojem pro genetické manipulace a transplantační experimenty. Roku 1994 se poprvé podařilo injikovat izolované buňky z varlat myši do semenotvorných kanálků sterilního samce myši za účelem obnovy spermatogeneze (Brinster and Zimmerman, 1994). Během let se stejných výsledků podařilo dosáhnout i u dalších modelových organismů: potkan, křeček, pes, prase, koza, ovce, skot, kur nebo opice (Kanatsu-Shinohara and Shinohara, 2013).

S úspěchem byla provedena i xenogenní transplantace trasgenních SSCs potkana do imunodeficientní myši (Clouthier et al., 1996).

4.2.2.5 Kmenové buňky gonád

Za účelem získání multipotentní linie kmenových buněk pro terapeutické účely, byla izolována nová buněčná populace z lidských varlat připomínající mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells; MSCs). Buňky nazvané kmenové buňky gonád (gonadal stem cells) jsou snadno dostupné a mají podobné vlastnosti a diferenciací potenciál jako MSCs. Buňky popsané v této studii vykazovaly obě vlastnosti charakterizující kmenové buňky, schopnost sebeobnovy a diferenciace. Byla u nich také potvrzena exprese genů typických pro ESCs, jako je Nanog a Oct4 a zároveň se lišily od ostatních kmenových buněk odvozených od zárodečné linie absencí exprese genů typických pro buňky zárodečné linie (Dazl, Vasa). Naopak tyto buňky jeví stejnou morfologii, diferenciací potenciál a podobný expresní profil jako MSCs, ale bez exprese hematopoetických markerů, tedy identifikátorů MSCs (Gonzalez et al., 2009).

4.2.3 Somatické buňky varlat

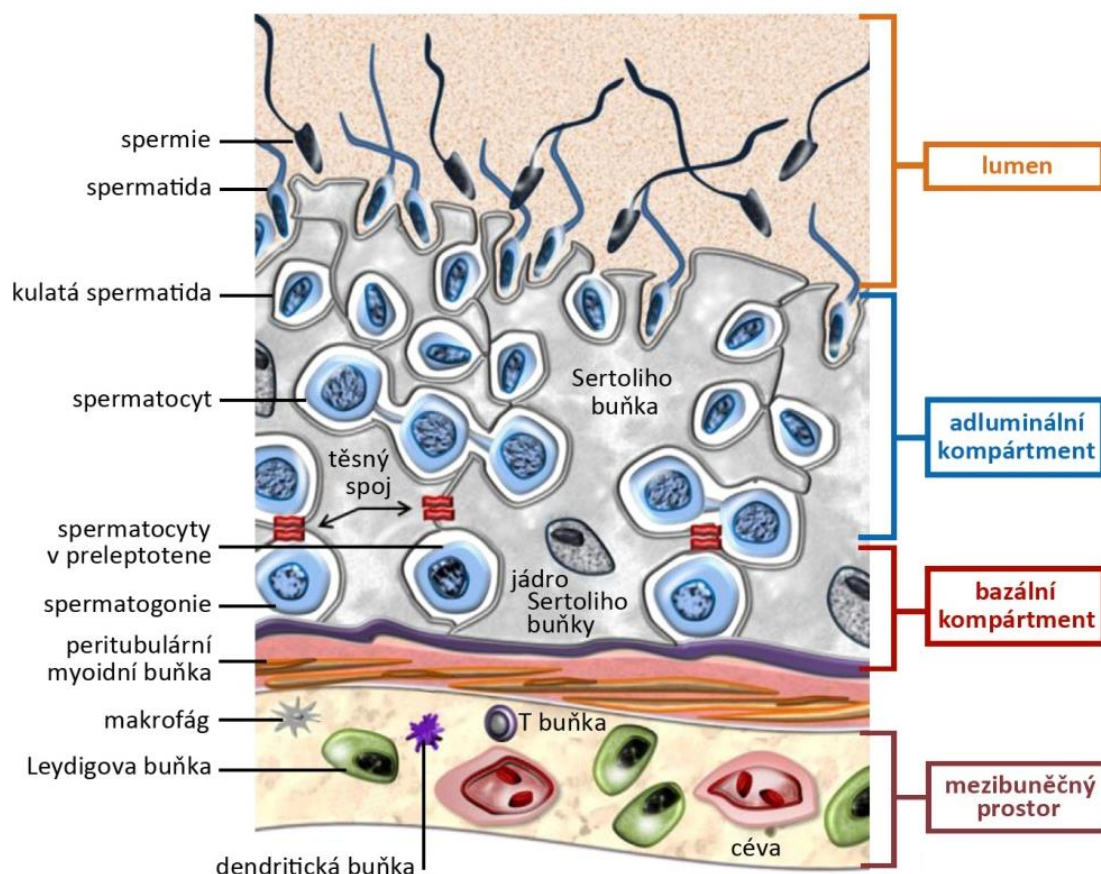
Ve varlatech existují tři typy somatických buněk: Sertoliho buňky, Leydigovy buňky a peritubulární myoidní buňky. K proliferaci těchto buněk dochází v prenatálním období života. Jakmile je ale jejich populace ustanovena, proliferace ustává a v dospělých jedincích k ní dochází velmi zřídka.

4.2.3.1 Sertoliho buňky

Sertoliho buňky jsou diferencované buňky semenotvorných kanálků varlat, jejichž hlavní úlohou je podporovat spermatické buňky během spermatogeneze. Tato podpůrná funkce je strukturální a ochranná, ale také sekreční, protože Sertoliho buňky produkují výživné a regulační látky. Zároveň fagocytují aberantní zárodečné buňky či zbytkové části cytoplazmy a hrají úlohu při uvolňování spermatid (Johnston et al., 2008). Sertoliho buňky mají zřejmě také schopnost třídění a přeuspořádání zárodečných buněk, které se pravděpodobně neuplatňuje za běžných podmínek, nicméně ukazuje na schopnost vzájemného rozlišení Sertoliho buněk se zárodečnými buňkami a na jejich úzkou interakci (Russell et al.,

1996a). S tím souvisí fakt, že produkce zárodečných buněk je závislá na množství Sertoliho buněk, přičemž období vzniku a časného vývoje Sertoliho buněk se ukázalo jako kritické (Orth et al., 1988).

Sertoliho buňky, na rozdíl od mobilních zárodečných buněk, jsou umístěny na bazální lamině epitelu semenotvorného kanálku a dosahují až k jeho povrchu, což je důležité pro jejich funkci. Přilehlé Sertoliho buňky jsou spojeny těsnými spoji a tvoří tak hemato-testikulární bariéru, která rozděluje epitel na dva kompartmenty (Obr. 5): bazální obsahující spermatogonie a adluminální, kde jsou ostatní stádia zárodečných buněk (Dym and Fawcett, 1970).

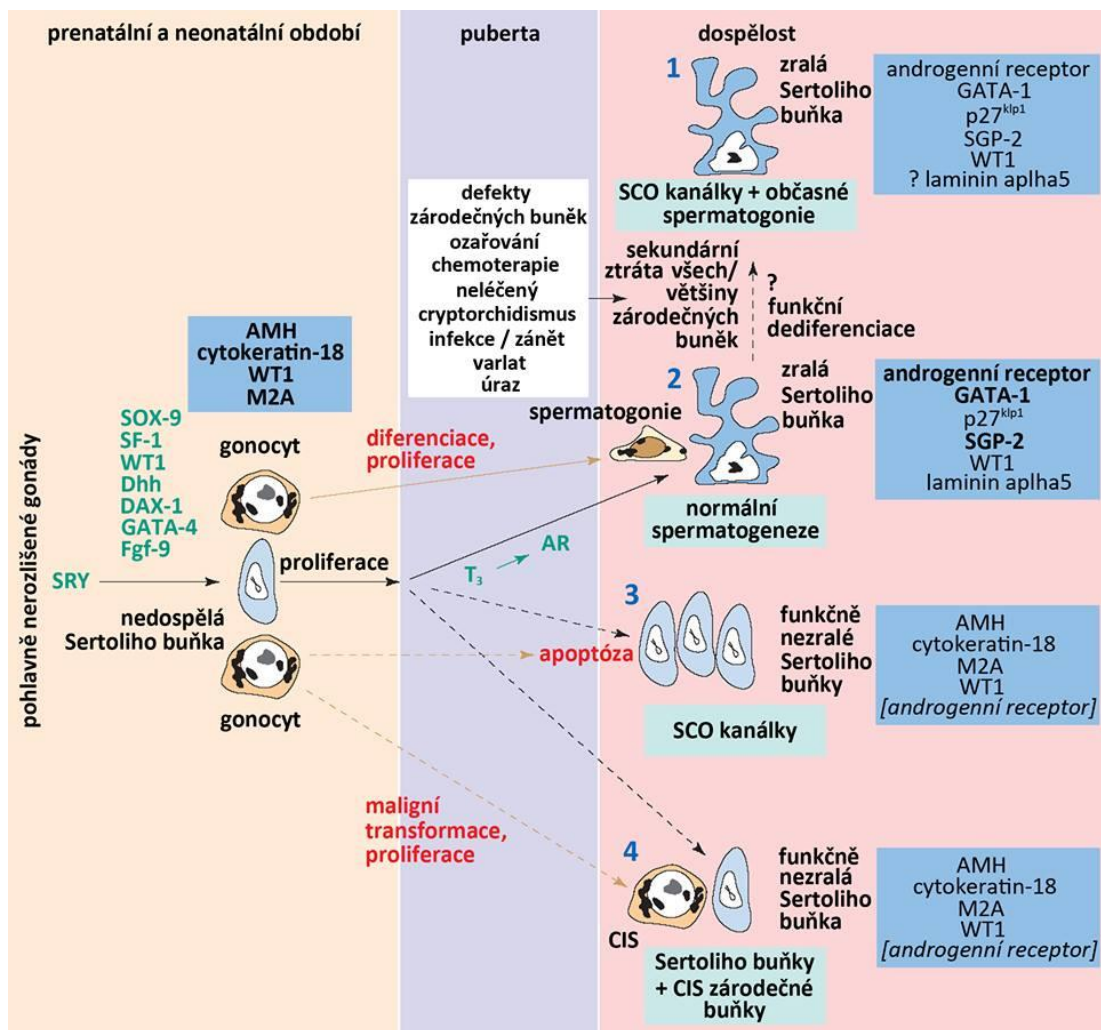


Obrázek 5 Struktura semenotvorného kanálku. Na bazální membráně myoidních buněk jsou znázorněny Sertoliho buňky a maturující zárodečné buňky. Kolem kanálku je extracelulární matrix s Leydigovými buňkami, makrofágy, dendritickými buňkami, T buňkami a cévami. Těsné spoje mezi Sertoliho buňkami tvoří hemato-testikulární bariéru a vytváří tak bazální a adluminální kompartment. Spermatogeneze postupuje směrem do středu kanálku. (převzato a upraveno podle Kaur et al., 2014).

Signalizace a sekrece parakrinních faktorů v rámci buněk této struktury se odehrává pomocí vodivých spojení a desmozomů. Adluminální kompartment tvoří

imunologicky privilegovanou oblast, protože spermatocyty a spermatidy se vyvíjejí až po vytvoření tolerance imunitního systému k buňkám vlastního těla. Imunitní systém tedy může rozpoznávat antigeny nacházející se na těchto buňkách (Kaur et al., 2014). Toto imunologicky privilegované prostředí je lákavým cílem pro transplantace a xenogenní transplantace zárodečných buněk, nicméně tyto pokusy byly úspěšné až při použití imunodeficientních jedinců (Clouthier et al., 1996; Russell LD et al., 1996b).

Maturované a diferencované Sertoliho buňky vznikají z embryonálních Sertoliho buněk (eSC) během období puberty. Embryonální Sertoliho buňky hrají zásadní roli ve vývoji varlat a při určení samčího pohlaví během embryogeneze. Během adolescence ztrácí schopnost proliferace a prochází radikální změnou morfologie i funkce. Mezi hlavní faktory ovlivňující maturaci a diferenciaci Sertoliho buněk patří hormony jako např. thyroidní hormon nebo FSH, a také interakce se zárodečnými buňkami (Obr. 6) (Sharpe et al., 2003).



Obrázek 6 Schéma znázorňující normální i patologickou maturaci Sertoliho buněk. Modré boxy ukazují změny v expresi markerů maturace, tučným písmem jsou označeny ty, které jsou závislé na stádiu diferenciace. Faktory v zelené barvě hrají roli v počáteční diferenciaci nebo závěrečné maturaci Sertoliho buněk. SCO: Sertoli cell only syndrome (přítomny jsou pouze Sertoliho buňky); CIS: carcinoma-in situ; SGP-2: sulphated glycoprotein 2; WT1: Wilms' tumour gene; AMH: anti-Müllerian hormon; T₃: thyroïdní hormon; AR: androgenní receptor (převzato a upraveno podle Sharpe et al., 2003)

4.2.3.2 Kultivace Sertoliho buněk

Sertoliho buňky jsou terminálně diferencované, tudíž se obecně považují za buňky s malou proliferační aktivitou a jejich počet je u dospělých jedinců stálý. Jak bylo zmíněno výše, jejich funkcí v organismu je podporovat zárodečné buňky a díky tomu jsou využívány také *in vitro* jako podpůrná výživovací vrstva buněk pro zárodečné kmenové buňky. Z tohoto důvodu bylo zásadní získat linii těchto buněk.

První linie Sertoliho buněk (TM4 linie) byla izolována z primární kultury založené z varlat nedospělé myši. Během kultivace byly buňky selektovány na základě morfologie a reakci na působení hormonů, nicméně reakce na FSH

odpovídala spíše nematurovaným Sertoliho buňkám (Mather, 1980). Imortalizace Sertoliho buněk bylo několikrát dosaženo infekcí primárních kultur virem SV40 a HPV 16, nebo transfekcí SV40 T-antigenem (Hess and França, 2005). Linie Sertoliho buněk vzniklá transfekcí byla použita jako podpůrná vrstva pro kultivaci zárodečných buněk se stejnou efektivitou jako v případě použití podpůrné vrstvy složené z primárních Sertoliho buněk. U takto připravené linie probíhala exprese genů specifických pro Sertoliho buňky jako např. SCF společně s růstovými faktory jako např. bFGF, LIF a TGF- β , které jsou zásadní pro funkci Sertoliho buněk (Hofmann et al., 2003).

Žádná z těchto linií však nemá všechny vlastnosti Sertoliho buněk a každý experiment by měl být vždy srovnáván s výsledky na primárních kulturách (Hess and França, 2005). Roku 2005 se podařilo založit proliferačně aktivní kulturu Sertoliho buněk bez nutnosti buněčné transformace. Zesílení exprese genů pro inhibitory diferenciací proteinů (Inhibitor of Differentiation Proteins) umožňuje Sertoliho buňkám v kultuře znovu vstoupit do buněčného cyklu a podporuje tak jejich proliferaci. Tyto proteiny jsou zásadní pro proliferaci a diferenciaci a jsou přirozeně exprimovány Sertoliho buňkami jako odpověď na působení hormonů a růstových faktorů (Chaudhary et al., 2005).

Pomocí optimalizace kultivačních podmínek bylo podobných výsledků dosaženo, jak u myši, tak u člověka. Sertoliho buňky, které získaly *in vitro* schopnost znovu proliferovat, si zachovaly svůj expresní profil. Není však jasné, zda u buněk opravdu došlo k opětovnému vstupu do buněčného cyklu, nebo zda při zakládání buněčných kultur byly použity progenitory Sertoliho buněk. Protože však kultury byly zakládány z dospělých jedinců, je jedním ze závěrů, že Sertoliho buňky nemohou být buňky terminálně diferencované. Jejich neproliferativní stav *in vivo* by mohl být způsoben rovnováhou inhibitorů buněčného cyklu, která je ale přenesením buněk do kultury porušena. Na rozdíl od ostatních somatických buněk varlat s ukončenou diferenciací, jsou navíc Sertoliho buňky schopné opravovat dvouvláknové zlomy DNA (Ahmed et al., 2009; Chui et al., 2011).

Názor, že Sertoliho buňky nejsou terminálně diferencované, podporuje *in vivo* studie provedená u křečka džungarského. Počet Sertoliho buněk se podařilo u dospělých křečků modifikovat hormonální léčbou pomocí FSH. Sertoliho buňky

proliferující *in vivo* měly vlastnosti jak maturovaných, tak nediferencovaných buněk, z čehož vyplývá, že by mohlo jít o jakési přechodné stádium (Tarulli et. Al, 2006).

V průběhu dalšího výzkumu byla dokonce získána buněčná kultura eSCs pocházející z buněk odebraných při biopsii varlat z dospělých pacientů s poruchami spermatogeneze. Na základě analýzy exprese genů typických pro Sertoliho buňky před maturací (cytokeratin 18, anti-Müllerian hormon, M2A antigen), autoři došli k závěru, že u některých pacientů došlo k dediferenciaci maturovaných Sertoliho buněk v důsledku nepřítomnosti funkčních zárodečných buněk. Z toho vyplývá, že nejen Sertoliho buňky jsou nepostradatelné pro spermatogenezi zárodečných buněk, ale že i samotná probíhající spermatogeneze je nutná pro udržení Sertoliho buněk v plně diferencovaném stavu (Steger et al., 1999).

Není však jisté, zda eSCs vznikly dediferenciací nebo zda byly biopsií získány Sertoliho buňky s nedokončenou diferenciací. Nicméně v *in vitro* podmínkách byl získán další typ kultury, pocházející původem z diferencovaných buněk a označovaný jako eSC-like buňky. Reprogramací myších fibroblastů také vznikla kultura exprimující geny specifické pro eSCs. Buňky získané působením pěti transkripčních faktorů (Nr5a1, Wt1, Dmrt1, Gata4, Sox9) podstoupily epiteliálně-mezenchymální tranzici a získaly tak schopnost tvořit složitější struktury i interagovat se zárodečnými buňkami v kultuře. Exprese těchto pěti faktorů je zároveň dostačující i nutná pro správnou funkci Sertoliho buněk (Buganim et al., 2012).

Další typ kultury byl získán po biopsii varlat pacientů bez spermií v testikulární tkáni. U těchto pacientů byl diagnostikován syndrom SCO (Sertoli Cell Only Syndrome), což je onemocnění charakteristické absencí zárodečných buněk v semenotvorných kanálcích. Navíc byly příznaky tohoto onemocnění u některých pacientů spojeny i s ukončením maturace zárodečných buněk (maturation arrest). Všechny izolované buňky byly vždy kultivovány společně a pod vlivem různých médií. TSCs v této kultuře vytvářely kolonie a diferencovaly *in vitro* do různých druhů buněk jako např. neuron-like buňky (Stimpfel et al., 2012).

Po objevení fenoménu indukovaných pluripotentních buněk, přišla na řadu otázka, zda je možné diferencované buňky přímo měnit na buňky jiné linie. U Sertoliho buněk toho lze dosáhnout pomocí devíti transkripčních faktorů (Ascl1,

Ngn2, Hes1, Id1, Pax6, Brn2, Sox2, c-Myc, Klf4), jejichž expresí jsou buňky převedeny zpět do multipotentního stavu bez předešlého navození pluripotence. Takto indukované buňky mají vlastnosti neurálních kmenových buněk a byly proto označeny jako indukované neurální kmenové buňky (induced neural stem cells; iNSCs). S neurálními kmenovými buňkami mají iNSCs podobný expresní profil a diferencují do gliových buněk a funkčních neuronů, které dokonce vytváří *in vivo* synapse. Zároveň si ale stále udržely schopnost sebeobnovy (Sheng et al., 2011).

4.2.3.3 Leydigovy buňky

Dalším somatickým typem buněk testikulární tkáně jsou Leydigovy buňky. Tyto buňky jsou hlavním zdrojem testosteronu a jsou tedy zcela zásadní pro vývoj samčích pohlavních znaků a pro spermatogenezi. Podle jedné hypotézy Leydigovy buňky diferencují z prekursorů vřetenovitého tvaru, které již vykazují některé vlastnosti diferencovaných buněk. Tyto prekurzory pak pocházejí z nediferencovaných Leydigových kmenových buněk (stem Leydig cells, SLCs). SCLs byly identifikovány a izolovány z varlat juvenilního potkana. V buněčné kultuře se tyto buňky byly schopny neomezeně dělit. Jejich diferenciaci byla provedena, jak *in vivo* pomocí transplantace do hostitelského potkana, tak i *in vitro*. Po diferenciaci *in vitro* vzniklé buňky produkovaly testosteron. Navíc u nich probíhala exprese receptoru pro LIF, což je, jak je zmíněno výše, faktor zásadní pro sebeobnovu PGCs a kultivaci některých kmenových buněk (Ge et al., 2006). Podle další studie jsou jako progenitory Leydigových buněk považovány buňky testikulárních cév, a to konkrétně buňky hladkého svalstva cév a pericyty. Tyto buňky připomínají neurální kmenové buňky včetně aktivní exprese genu pro nestin. *In vivo* se z těchto progenitorů podařilo u potkana vytvořit celou novou populaci Leydigových buněk (Davidoff et al., 2004). V další studii byla provedena úspěšná transplantace LSCs do myši bez Leydigových buněk. U příjemce byl poté pozorován nárůst koncentrace testosteronu a tedy jeho *de novo* syntéza transplantovanými buňkami. Tato populace LSCs byla součástí tzv. testikulární vedlejší populace buněk, což je populace buněk selektována pomocí průtokové cytometrie. V tomto případě jsou buňky barveny pomocí fluorescenčního barviva Hoechst, které je na rozdíl od diferencovaných buněk u této populace efektivněji vylučováno pomocí

membránového transportéru rezistence k širokému spektru léčiv (multidrug resistance) (Lo et al., 2004). Je možné, že tyto tři studie popisují stejnou populaci kmenových buněk anebo může jít také o různě diferencovaná stadia (Liu et al., 2009).

4.2.3.4 Peritubulární myoidní buňky

Peritubulární myoidní buňky jsou rovněž terminálně diferencované a obklopují semenotvorné kanálky varlat. Obsahují velké množství aktinových vláken, jejichž rozmístění v myoidních buňkách je druhově specifické. Projevují se u nich vlastnosti buněk hladké svaloviny, jsou kontraktilní a podílí se na transportu spermatických buněk a testikulární tekutiny v kanálcích. Zajišťují strukturální integritu semenotvorného kanálku a zároveň regulují spermatogenezi sekrecí velkého množství látek, z nichž některé ovlivňují funkci Sertoliho buněk (Maekawa et al., 1996). Peritubulární myoidní buňky jsou hlavním zdrojem testikulárního LIF, přestože je produkován i ostatními somatickými testikulárními buňkami (Piquet-Pellorce et al., 2000). Přítomnost kmenových buněk pro myoidní buňky nebyla zatím ve varlatech prokázána (Liu et al., 2009).

5 MATERIÁL

5.1 Živý materiál

5.1.1 Pokusná zvířata

Jedinci *Xenopus tropicalis* používaní v experimentech pocházejí z chovů PŘF UK. Jednalo se konkrétně o kmen Nosek, který byl dlouhodobě chován v Laboratoři vývojové biologie a kmen Nigerian Strain, který byl dodán firmou European Xenopus Resource Centre (Portsmouth).

5.1.2 Buněčné kultury

Smíšená buněčná kultura TSCs a pre-Sertoliho buněk byla založená z varlat juvenilních samců *Xenopus tropicalis* kmene Ivory Coast a kmene Nigerian Strain v Laboratoři vývojové biologie.

5.2 Kultivační a transfekční média

Kultivační médium s LIF

L-15 Leibovitz (Sigma-Aldrich)	33,33%	(150 ml)
RPMI 1640 HEPES mod. (82 mg/ml)(Sigma-Aldrich)	33,33%	(30 ml)
FBS (Fetal bovine serum) (Life Technologies)	10%	(45 ml)
glutamin (2 mM) (Sigma-Aldrich)	1%	(4,5 ml)
7,5% NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich)	0,13%	(8 ml)
gentamycin (64 g/ml)	0,005%	(360 µl)
pyruvát sodný (1 mM) (Sigma-Aldrich)	0,66%	(3 ml)
2-mercaptoetanol (0,1 mM) (Sigma-Aldrich)	0,26%	(1,2 ml)
recombinant mouse LIF (1000 U/ml) (ESGRO; Milipore)	0,01%	(45 µl)
deionizovaná H ₂ O	46,20%	(207,9 ml)

Transfekční médium

L-15 Leibovitz (Sigma-Aldrich)	33,33%	(50 ml)
RPMI 1640 HEPES mod. (82 mg/ml)(Sigma-Aldrich)	33,33%	(10 ml)
FBS (Life Technologies)	6,67%	(10 ml)
glutamin (2 mM) (Sigma-Aldrich)	0,66%	(1 ml)
7,5% NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich)	0,13%	(2,6 ml)
deionizovaná H ₂ O	25,94%	(76,4 ml)

Přípravné transfekční médium

L-15 Leibovitz (Sigma-Aldrich)	33,33%	(10 ml)
RPMI 1640 HEPES mod. (82 mg/ml)(Sigma-Aldrich)	33,33%	(2 ml)
glutamin (2 mM) (Sigma-Aldrich)	0,66%	(200 µl)
7,5% NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich)	0,13%	(520 µl)
deionizovaná H ₂ O	32,61%	(17,28 ml)

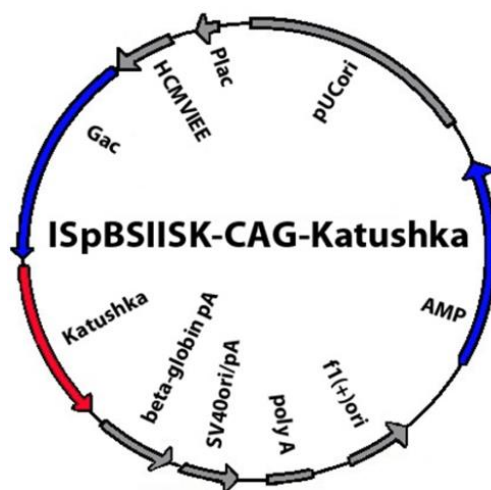
Nukleofekční médium

RPMI 1640 HEPES mod. (82 mg/ml)(Sigma-Aldrich)	33,33%	(6,5 ml)
FBS (Life Technologies)	10%	(10 ml)
deionizovaná H ₂ O	83,50%	(83,5 ml)

5.3 Materiál pro transfekci

5.3.1 Plazmid

Pro transfekční experimenty byl použit plazmidový vektor ISpBSIISK-CAG-Katushka obsahující gen pro červený fluorescenční protein Katushka RFP, jehož exprese je pod kontrolou CAG promotoru (Obr. 7). Plazmid by zkonstruován v Laboratoři vývojové biologie (Fuxová, 2013).



Obrázek 7 plazmidový vektor ISpBSIISK-CAG-Katushka

5.3.2 Lipofekční činidla

- jetPEITM Polymer-based DNA transfectionreagent (101-01N, Bioparc)
- LipofectamineTM 2000 (11668-027, InvitrogenTM)
- Nanofectamine (Q0002-006, BioPath)
- TransFectinTM Lipid Reagent (170-3351, Bio-Rad)
- Viromer® plasmid – TRIAL obsahující Viromer® RED a Viromer® YELLOW (Lipocalyx)

5.3.3 Transfekční roztoky

- **Nukleofekční roztok:**

5 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM Na₂HPO₄; 100 mM NaCl.

Roztok byl připraven ve sterilní deionizované vodě, sterilizován pomocí autoklávu a filtrován přes sterilní 0,22 µm filtr.

Roztoky pro kalcium fosfátovou transfekci:

- 2M CaCl₂, filtrace přes 0,22 µm filtr
- 2x HBS pufr:
300 mM NaCl; 10mM KCl; 3 mM Na₂HPO₄×12H₂O; 11 mM glukóza; 42mM HEPES
Roztok byl připraven ve sterilní deionizované vodě, filtrován přes sterilní 0,22 µm filtr, pH7,05
- TE pufr (pro ředění pDNA): 10 mM TRIS; 1mM EDTA; pH7,05

5.4 Analýza DNA

5.4.1 PCR

- 10x Taq pufr s KCl (ThermoScientific)
- 25 mM MgCl₂ (ThermoScientific)
- 10 mM dNTP Mix (ThermoScientific)
- Taq DNA polymeráza 5 U/µl (EP0402, ThermoScientific)

5.4.2 Primery

Gen	přední primer	Velikost produktu (páry bazí)
	zadní primer	
c-myc	TGACCCTTCGGTGGTTTTCC	454
	CCGCCTCTTGTCGTTCTCTT	
klf4	TTCTCACCTCCACCTCCT	556
	ACAGTCTCTGCCCATCAGC	
oct25	ACTCCGACTTATTTGGGTGGAA	464
	TCCCTTGTTGGTTGGTCTCC	
oct60	CACTTGCTGGTTTAGGGGGT	264
	GGAGGGGGCATTGTAGTTCC	
oct91	GCAGAAAGTGGCATCTCCAG	201
	CGTGATACGCTTGTGCTTCA	
sox2	GGGCTCCAACAACCAGAGT	804
	TAGTGTTGGGACATGTGCAGT	
tert	TGACCAGCCAAAACGGGATG	484
	TCGTAGACGAATCCAAGAGCA	
dazl	CAAGCTTTTGTGTTGCCAGA	1114
	AATGCCATGATCCCAAAGAG	
ddx4	TGCATGCAATGAGGGATGTTG	899
	AGATGAAGGAGCACTGACGTA	
ddx25	AAACGCATCCCAAGCGGAA	435
	CGACTCAGCATAGCCAGGAC	
kitlg	ACTGAAGGAGGACCATACCCA	789
	GGGAGGGATTTGTGGCTGAA	
lif	TGTGCAACTGCTGATTCTCC	581
	CATTGACTGCTTGGTGGATG	
sox9	AACTCCTCCAACCTACCCCC	143
	CCTCACTGCTCAGTTCACC	
odc1	GACTGTGCCAGTAAGACGG	234
	GCGGCAGACAGCTTTTGAG	

Tabulka 1 Sekvence primerů PCR reakce použité pro analýzu expresního profilu TSCs a pre-Sertoliho buněk *Xenopus tropicalis*.

5.4.3 Restrikční endonukleázy

Restrikční analýza			
Restrikční endonukleáza	BamHI	XbaI	SacI
Štěpená sekvence	G↓GATCC	T↓CTAGA	GAGCT↓C
Výsledné fragmenty po štěpení plazmidu (bp)	337, 1481, 1641, 3136	834, 1130, 1651, 2980	otevření vektoru
Pufr	Fast Digest	Fast Digest	Pufr SacI
Inkubace	15 min 37°C	15 min 37°C	1 h 37°C

Tabulka 2 Seznam použitých restrikčních endonukleáz. Uvedeny jsou příslušné pufrы a reakční podmínky.

5.4.4 Sady chemikálií

- GeneJET PCR Purification kit (Fermentas)
- NucleoBondXtra Maxi kit (MacheryNagel)
- PureYield Plasmid Miniprep (Promega)
- RevertAid H Minus FirstStrand cDNA Sythesis Kit (K1632, ThermoScientific)
- RNeasa® Mini Kit (74104, Qiagen)

5.5 Roztoky pro IVF a transplantace

- 20× MMR: 2M NaCl; 40 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 40 mM CaCl₂; 100mM HEPES; deionizovaná H₂O; pH 7,7 – 7,8
- 0,05× MMR: 2,5 ml 20× MMR; 997,5 ml deionizované H₂O; pH 7,7 – 7,8
- 0,05× MMR + Gentamycin: 2,5 ml 20× MMR; 997,5 ml deionizované H₂O; 1 ml Gentamycinu; pH 7,7 – 7,8
- 1× MMR + Gentamycin: 5 ml 20× MMR; 95 ml deionizované H₂O; 100 µl Gentamycinu; pH 7,7 – 7,8
- 2,2% roztok cysteinu: 0,5 ml 20× MMR; 99,5 ml deionizované H₂O; 2,2 g L-cysteinu; pH 7,7 – 7,8
- 1% roztok agarózy v 0,05× MMR
- 0,2% MS-222, narkotizující roztok: 0,2 g MS-222; 0,2 g NaHCO₃; 100 ml destilované H₂O
- 0,4% MS-222, usmrcovací roztok: 2 g MS-222; 2 g NaHCO₃; 500 ml destilované H₂O

5.6 Další roztoky

- DMSO 41640 (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 36324N (BDH)
- PBS (phosphate buffered saline): 136 mM NaCl, 1,5 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 2,25 mM KH₂PO₄, pH 7,35
- 2/3 PBS: 2 díly PBS:1 díl H₂O
- 5× TBE (Tris-borate-EDTA pufr): 200mM Tris; 10 mM EDTA; 450 mM H₃BO₃

5.7 Barvení buněk a protilátky

- Anti-Mouse IgG – FITC (F6257, Sigma-Aldrich)
- Anti-Mouse IgG – TRITC (T5393, Sigma-Aldrich)

- Fast Red TR/Naphthol AS-MX Alkaline Phosphatase Substrate Tablettes Set (F4648, Sigma)
- Hoechst 33342: 1 mg/ml
- Propidium jodid: 1 mg/ml
- Neuronal cell surfacemarker (zn-12 , Developmental Studies Hybridoma Bank)
- Trypan Blue stain 0,4% (T 10282, Life Technologies™)

5.8 Chemikálie a ostatní materiál

- Agaróza 50004 (Lonza)
- Ampicilin sodium salt 0339 (Amresco)
- BFM (bromfenolová modř): 50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM (Sigma Aldrich)
- 2% BSA v 2/3 PBS (Sigma Aldrich)
- Cystein C7352 (Sigma-Aldrich)
- DAPI DES1000L (Intimex)
- 6× DNA Loading Dye R0611 (Fermentas)
- Filtrační nástavce sterilní - 30 mm, velikost pórů 0,22 µm (R666871, P-LAB)
- Sítka pro filtraci buněk CellTrics® 20 µm, sterile single packed (04-004-2325, Partec)
- 38% Formaldehyd 30251 (Lach-Ner)
- 2% Gelatin solution (G1393-100ML, Sigma-Aldrich)
- Gene Ruler DNA Ladder mix (SM0333, Fermentas)
- Gentamycin – Gentaveto – 5 (V.M.D.)
- Lidský hCG C1063 (Sigma-Aldrich)
- 15 mM NH₄Cl
- Montovací médium - Mowiol/DAPI
- Papain preparation (61,25 µg/ml) (L2223, Biochrom AG)
- 0,5% Triton X -100 v 2/3 PBS
- Trypsin-EDTA solution 10x (T4174, Sigma)

5.9 Přístroje

- Amaxa®Nucleofector® (Lonza)
- MCO-19 AIC Sterisonic® UVH Incubator (Panasonic)
- Stereomikroskop Stemi 2000 (Zeiss)
- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)

- Centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf)
- Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen)
- Elektroforetický zdroj Power station 300 (Labnet Internacional)
- Flow box EM Box 120 (Schoeller Instruments)
- Fluorescenční stereomikroskop Olympus SZX16 (Olympus Optical)
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX40F (Olympus Optical)
- Inverzní mikroskop Olympus IX 71 (Olympus Optical)
- Inverzní mikroskop Wilovert® (WILL Wetzlar)
- Mikroinjektor IM 300 (Narisige)
- Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop)
- Programmable Thermal Controller PTC – 100™ (Biotech)
- Průtokový cytometr LSRII
- Třepačka Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Vortex Ika Works, Minishaker MS1, (Ika Works)
- Vodní lázeň Techne TE 10D Tempette® (Techne)
- Vyhřívaný blok Eppendorf ThermoStat Plus (Eppendorf)
- UV Transiluminátor TS-20E, 254 nm (UVP)
- XP cycler (BIOER)

6 METODY

6.1 RT-PCR

Pro vyhledání sekvence genů byly použity databáze Ensembl (www.ensembl.org) a Xenbase (www.xenbase.org). Primery byly navrženy pomocí programu Primer 3 v. 0.4.0 (www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/).

Pro izolaci RNA z buněk byla použita sada chemikálií RNeasy® Mini Kit (74104, Qiagen), postup byl proveden podle instrukcí výrobce. RNA byla izolovaná z varlat dospělců *Xenopus tropicalis*, z podpůrné vrstvy pre-Sertoliho buněk kultury a z TSCs kultivovaných v kultivačním médiu s přídavkem LIF a v kultivačním médiu bez LIF. Jednotlivé buněčné typy byly separovány pomocí metody Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) (kapitola 6.6). Koncentrace izolované RNA byla stanovena na přístroji Nanodrop, při vlnové délce 260 nm. RNA pak byla použita pro reverzní transkripci se vstupní koncentrací 500 ng pro každou reakci. K přípravě

cDNA byl použit RevertAid H Minus FirstStrand cDNA Sythesis Kit (K1632, ThermoScientific) s primerem - oligo(dT)₁₈. Syntetizovaná cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci (Tabulka 3).

Složky PCR směsi:

- 37,5 µl H₂O
- 5 µl 10x Taq pufru s KCl (ThermoScientific)
- 3 µl 25 mM MgCl₂ (ThermoScientific)
- 1 µl 10 µM předního primeru (F)
- 1 µl 10 µM zadního primeru (R)
- 1 µl 10 mM dNTP Mix (ThermoScientific)
- 1 µl templátu (ss cDNA)
- 0,5 µl Taq DNA polymeráza 5 U/µl (EP0402, ThermoScientific)

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	94°C	1 min	35
Nasedání primerů	61°C	2 min	
Syntéza	72°C	2 min	
Závěrečná syntéza	72°C	10 min	1

Tabulka 3 Podmínky PCR reakce.

Na závěr byly amplifikáty PCR vizualizovány pomocí elektroforetické analýzy na 1 – 1,5% agarózových gelech obsahujících etidium bromid.

6.2 Amplifikace plazmidového vektoru

Plazmid byl amplifikován v bakteriích One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (C404010, Invitrogen). Transformace bakterií byla provedena dle instrukcí výrobce. Transformované bakterie byly vysety na plotny s LB agarem a ampicilinem a přes noc inkubovány při 37°C. Vybrané kolonie bakterií byly použity na inokulaci 2 ml tekutého tryptosofosfátového média s ampicilinem a zároveň byla jejich část vyseta na záložní plotnu s LB agarem a ampicilinem. Bakterie byly v tekutém médiu inkubovány po dobu 14 h při 37 °C a 220 rpm v třepačce. Izolace pDNA z bakterií byla provedena pomocí PureYield Plasmid Miniprep Systém kitu dle instrukcí výrobce. Koncentrace DNA byla stanovena na přístroji Nanodrop (při vlnové délce 260 nm) a poté byla DNA použita na kontrolní restriční analýzu.

Kolonie bakterií ze záložní plotny, vybrané podle restrikční analýzy, byly použity na inokulaci 2 ml tryptosofosfátového média s ampicilinem a inkubovány 8 h při 37 °C a 220 rpm. 300 µl bakteriální kultury bylo ředěno 300 ml tryptosofosfátového média s ampicilinem a inkubováno dalších 14 h při 37 °C a 150 rpm v třepačce. Izolace DNA byla provedena pomocí Nucleo Bond Xtra Maxi kitu (MacheryNagel) dle instrukcí výrobce. DNA byla následně přečištěna srážením v 70% etanolu. Po stanovení koncentrace DNA byla provedena kontrolní restrikční analýza plazmidu.

6.3 Restrikční reakce

pDNA byla štěpena pomocí vybraných restrikčních endonukleáz (Tabulka 2). Reakční směs se skládala z 100-900 ng pDNA, 2 µl pufru, 1 µl restrikční endonukleázy a byla doplněna vodou do celkového objemu 20 µl. Inkubace probíhala při teplotě 37°C po dobu 1 h nebo v případě Fast Digest endonukleáz 15 min. Vzorky byly vizualizovány pomocí elektroforetické analýzy na 0,7% agarózových gelech obsahujících etidium bromid.

6.4 Kultivace smíšené buněčné kultury

Smíšená buněčná kultura *X. tropicalis* byla kultivována v termostatu při 29,5°C a v 5,5% atmosféře CO₂. Kultivační médium bylo standardně měněno 2 × týdně a zároveň byla kultura 1 x týdně pasážována pomocí roztoku Papainu standardním postupem. Médium bylo odsáto z kultivační lahve a na buňky byl aplikován roztoku Papainu. Po uvolnění buněk z kultivační lahve byla buněčná suspenze přenesena do zkumavky a inkubována 5 – 15 min za průběžného pipetování, tak aby došlo k úplné disociaci kolonií kmenových buněk. Po zastavení reakce papainu pomocí kultivačního média s FBS, byla suspenze centrifugována (5 min, 110 x g). Po odstranění supernatantu se buněčný pelet resuspendoval v čerstvém kultivačním médiu a zhruba polovina buněk se vrátila na kultivační lahev.

6.4.1 Vliv LIF v médiu

Buněčná kultura TSCs byla ve stejném množství rozdělena na 4 kultivační lahve. Médium bylo měněno 2 × týdně. Pro lahve č. 1 a 2 bylo používáno kultivační médium bez LIF. Pro lahve č. 3 a 4 bylo používáno kultivační médium s LIF. Pro lahve č. 2 a 4 bylo zároveň použito tzv. kondicionované médium – polovina média byla přidána čerstvá a polovina byla odebrána od stávajících buněk a přefiltrována.

6.4.2 Příprava jednobuněčné suspenze TSCs

Médium bylo odstraněno z kultivační lahve a na buňky byl aplikován roztok Trypsinu. Po uvolnění buněk z kultivační lahve byly kolonie kmenových buněk odděleny od podpůrné vrstvy pre-Sertoliho buněk pomocí sítka o velikosti oka 20 μm . Kolonie kmenových buněk zachycené na sítku byly přeneseny do zkumavky a centrifugovány (5 min, 110 x g). Po odebrání supernatantu se buněčný pelet resuspendoval v 5 ml roztoku Papainu a buněčná suspenze byla inkubována 15 min za stálého pipetování tak, aby došlo k úplné disociaci kolonií kmenových buněk. Po 15 min byla buněčná suspenze opět filtrována přes sítko o velikosti oka 20 μm , aby došlo k odstranění ne zcela disociovaných kolonií. Přefiltrovaná suspenze byla znovu naředěna médiem a centrifugována. Po odebrání supernatantu se buňky resuspendovaly v médiu, vzorek suspenze se obarvil 0,4% trypanovou modří a pomocí přístroje Countess® Automated Cell Counter bylo spočítáno množství buněk a určena jejich viabilita. Takto připravená buněčná suspenze byla následně používána pro různé typy experimentů uváděné v této diplomové práci.

6.5 Transfekce buněčné kultury plazmidovou DNA

6.5.1 Lipofekce

Lipofekce je způsob transfekce, kdy je DNA uzavřena do váčku ze syntetických lipidů, který má schopnost splynout s plazmatickou membránou buňky nebo být pohlcen endocytózou. V rámci této diplomové práce bylo vyzkoušeno několik lipofekčních činidel a u každého z nich byl optimalizován poměr použité

pDNA (μg) ku transfekční látce (μl). Buňky byly vždy den až dva předem inokulovány na 6ti jamkovou destičku, tzn. všechny uváděné hodnoty odpovídají jedné jamce na 6ti jamkové kultivační destičce.

6.5.1.1 LipofektaminTM2000

K 250 μl přípravného transfekčního média byla přidána pDNA (1,5 nebo 2 μg). K dalším 250 μl stejného média byl přidán LipofektaminTM (7 μl nebo 4 μl). Roztoky byly inkubovány 5 min a poté byly spojeny a promíchány. Po další 20 min inkubaci byla tato transfekční směs aplikována na buňky připravené ve 2 ml transfekčního média. Po 4 h bylo toto médium vyměněno za kultivační médium s $\frac{1}{2}$ LIF.

6.5.1.2 TransFectinTM

K 250 μl přípravného transfekčního média byla přidána pDNA (2; 2,5; 3; 4 μg). K dalším 250 μl stejného média byl přidán TransFectinTM (4; 5; 7; 7,5; 10 μl). Roztoky byly inkubovány 5 min a pak byly spojeny a promíchány. Po 20 min inkubaci byla tato transfekční směs nanесena na buňky připravené ve 2 ml transfekčního média. Po určité době (4; 24; 100 h) bylo médium vyměněno za kultivační médium s $\frac{1}{2}$ LIF.

V případě TransFectinuTM byla také provedena transfekce na buňkách v suspenzi během pasážování. Pro transfekční směs bylo použito 22,8 μg pDNA a 20 μl TransFectinuTM. Směs byla přidána k 6 ml buněčné suspenze v transfekčním médiu, která byla následně rovnoměrně rozdělena na 6ti jamkovou destičku. Po 24 h bylo médium vyměněno za kultivační médium s $\frac{1}{2}$ LIF.

6.5.1.3 jetPEITM (Polymer-based DNA transfection reagent)

Transfekční směs byla připravena smícháním 6 μl jetPEITM v 150 mM NaCl (celkový objem 100 μl) a 3 μg pDNA v 150 mM NaCl (celkový objem 100 μl). Směs byla inkubována 30 min a aplikována na buňky připravené ve 2 ml kultivačního média s $\frac{1}{2}$ LIF. Po 4 h bylo médium vyměněno za čerstvé.

6.5.1.4 Nanofectamine

K 100 μ l přípravného transfekčního média byly přidány 2 μ g pDNA. K dalším 100 μ l stejného média bylo přidáno 6 μ l Nanofectaminu. Roztoky byly inkubovány 5 min a pak byly spojeny a promíchány. Po inkubaci 20 min byla tato transfekční směs nanесena na buňky připravené ve 2 ml transfekčního média.

6.5.1.5 Viromer® plasmid

Vzhledem k rozdílné osmolaritě buněk savců a obojživelníků byl pufr E dodáváný v rámci kitu naředěn pomocí sterilní H₂O na 2/3 koncentraci. pDNA byla ředěna ve 2/3 pufru E na cílovou koncentraci 11,1 ng/ μ l. 5 μ l činidla Viromer RED a Viromer YELLOW bylo ředěno vždy ve 120 μ l 2/3 pufru E. Naředěná pDNA byla smíchána s připravenými činidly Viromer v poměru 9:1 a směs byla inkubována po dobu 30 min. Do jedné jamky 6ti jamkové destičky s 2 ml kultivačního média s ½ LIF bylo vždy aplikováno 200 μ l směsi. Po 4 nebo 20 h bylo vyměněno médium za čerstvé.

6.5.2 Kalcium fosfátová metoda

Při použití metody kalcium fosfátové transfekce dochází k přenosu DNA do buňky pomocí sraženiny obsahující kladně nabitý vápník a negativně nabitě fosfáty.

Buňky byly vždy den před experimentem vysety na 6ti jamkovou destičku, tzn. všechny uváděné hodnoty odpovídají jedné jamce této destičky. 6 μ g pDNA bylo naředěno na 140 μ l v 0,1x TE pufru. 140 μ l 2xHBS pufru bylo spojeno s 20 μ l CaCl₂. Pro některé jamky byl 2xHBS pufr nebo CaCl₂ ředěný na 2/3 koncentraci vzhledem k osmolaritě buněk *X. tropicalis*. Směs pufru a CaCl₂ byla poté nakapána do ředěné pDNA a byla inkubována 2 min. Vytvořená sraženina byla zkontrolována mikroskopem a pak byla nakapána na buňky bez přítomnosti média. Buňky byly se sraženinou inkubovány 15 min při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla sraženina odstraněna a k buňkám bylo přidáno kultivační médium s ½ LIF.

6.5.3 Nukleofekce

Pro nukleofekční experimenty byla vždy připravena jednobuněčná suspenze TSCs (kapitola 6.4.2). Po spočítání buněk se požadované množství přeneslo do mikrozku mávek a proběhla centrifugace (5 min, 110 x g). Po odebrání supernatantu

bylo k peletu přidáno 6 µg pDNA a 100 µl nukleofekčního roztoku. Buňky byly resuspendovány a ihned přeneseny do elektroporační kyvety. Nukleofekce byla provedena pomocí různých programů přístroje Amaxa®Nucleofector® (A-012, A-024, A-027, A-030, A-031, A-033, B-016, C-017, O-020, T-020, T-021, U-023). Bezprostředně po elektrickém pulzu bylo do kyvety přidáno nukleofekční médium a suspenze byla přenesena do mikrozkuřavky. Následovala 15 min inkubace při 29,5°C v 5,5% atmosféře CO₂. Po inkubaci byly buňky přeneseny na kultivační láhev o velikosti 25 cm² s kultivačním médiem s přídavkem LIF. Po 4 h či další den po transfekci bylo médium vyměněno.

6.6 FACS

Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) je způsob oddělování jednotlivých buněk na základě specifického rozptylu světla a fluorescenčních vlastností každé buňky. Buňky kultury *X. tropicalis* byly separovány na průtokovém cytometru LSRII v Servisním pracovišti pro světelnou mikroskopii a průtokovou cytometrii Ústavu molekulární genetiky, Akademie věd České republiky.

Transgenní buňky byly oddělovány na základě jejich vlastní RFP fluorescence dosažené transfekcí.

TSCs a buňky podpůrné vrstvy byly oddělovány po barvení fluorescenčním barvivem Hoechst 33342 jako vedlejší testikulární populace.

6.6.1 Příprava buněk pro FACS

6.6.1.1 Transgenní smíšená kultura kmenových buněk

Kultury transgenních buněk byly před separací disociovány pomocí roztoku Papainu obvyklým postupem (kapitola 6.4). Získaná buněčná suspenze byla vždy filtrována přes sítko s velikostí oka 20 µm, aby se odstranily ne zcela disociované kolonie TSCs.

6.6.1.2 Buňky určené pro izolaci RNA

Buňky určené pro izolaci RNA byly po odstranění média disociovány pomocí roztoku Papainu obvyklým postupem (kapitola 6.4). Získaná buněčná suspenze byla

poté filtrována přes sítko s velikostí oka 20 μm , aby se odstranily ne zcela disociované kolonie TSCs. Vzniklá suspenze byla barvena fluorescenčním barvivem Hoechst 33342 o konečné koncentraci barviva 1 $\mu\text{g/ml}$ média bez FBS. Doba barvení byla 2 h při teplotě 28°C. Bezprostředně před samotnou separací přístrojem byl k buněčné suspenzi přidán 1000x ředěný propidium jodid (1 mg/ml) pro identifikaci mrtvých buněk.

6.7 Detekce alkalické fosfatázy

Tato histochemická reakce potvrzuje přítomnost alkalické fosfatázy v buňkách a je jedním ze základních a všeobecně používaných testů prokazujících přítomnost některých typů kmenových buněk v kultuře.

Kultury TSCs se zformovanými koloniemi byly fixovány v 3,8% formaldehydu po dobu 20 min a následně promyty 2/3 PBS. Pro detekci alkalické fosfatázy byl použit Fast Red TR/Naphthol AS-MX Alkaline Phosphatase Substrate Tablets Set (F4648, Sigma) dle instrukcí výrobce.

6.8 Metoda zavěšené kapky

6.8.1 Příprava kultury metodou zavěšené kapky

Pro přípravu kultury metodou zavěšené kapky byla nejdříve připravena jednobuněčná suspenze TSCs (kapitola 6.4.2). Po celou dobu tohoto experimentu včetně přípravy buněčné suspenze bylo používáno pouze kultivační médium bez LIF. Buňky byly ředěny na koncentraci 5×10^5 buněk/ml. Na dno Petriho misky bylo nalito adekvátní množství 2/3 PBS (2-3 ml při použití Petriho misky o průměru 6 cm) a na vnitřní stranu víčka byly nakapány 20 μl kapky ředěné buněčné suspenze. Víčko s kapkami bylo otočeno o 180° a umístěno na Petriho miskou tak, aby kapky s buňkami visely nad vrstvou 2/3 PBS. Tímto způsobem byly buňky kultivovány při 29,5°C v 5,5% atmosféře CO_2 po dobu 48 h. Po dvou dnech byla zformovaná embryoidní tělíska přenesena do média a kultivována po dobu 3 dnů jako standardní suspenzní kultura. Po 3 dnech byla embryoidní tělíska po jednom

přenesena do jednotlivých jamek 24 jamkové kultivační destičky na želatinou potažená krycí sklíčka. Pro tyto experimenty byla použita krycí sklíčka o průměru 12 mm, která byla umístěna do jamek destičky a potažena roztokem 0,1% želatiny v 2/3 PBS. Sklíčka byla inkubována s roztokem želatiny přes noc při 29,5°C a na závěr promyta 2/3 PBS. Kultivace embryoidních tělísek na sklíčkách probíhala po dobu 7 dní s výměnou média každý 3. den.

V rámci experimentů vedoucích k diferenciaci kmenových buněk byly použity jak transgenní TSCs, tak i buňky z původní linie. Současně byla vždy provedena dvojité negativní kontrola. Buňky ze stejné kultivační lahve byly kultivovány na sklíčkách potažených želatinou a na sklíčkách bez želatiny, tzn. bez kultivace v kapkách a bez tvorby embryoidních tělísek.

Vyhodnocení diferenciací TSCs metodou zavěšené kapky bylo provedeno na základě imunohistochemického barvení pro identifikaci neurálních markerů.

6.8.2 Imunohistochemické barvení

Krycí sklíčka s buňkami byly opláchnuty 2/3 PBS a 20 min fixovány v 3,8% roztoku formaldehydu v 2/3 PBS. Po fixaci byla sklíčka 3 × 5 min promyta ve 2/3 PBS. Poté následovala 5 min inkubace v 15mM NH₄Cl a opět 3 × 5 min oplach ve 2/3 PBS. Permeabilizace buněk byla docílena působením 0,5% Triton X-100 v 2/3 PBS po dobu 2 min a opět následoval oplach 3 × 5 min ve 2/3 PBS. Poté byla sklíčka 45 min inkubována v 2% BSA v 2/3 PBS. Nato byla na sklíčka aplikována primární protilátka (Neuronal cell surfacemarker) ředěná 100× v 0,5% BSA v 2/3 PBS. Po 60 min inkubaci s primární protilátkou byla sklíčka znovu promyta 5 × 5 min ve 2/3 PBS. Pro vizualizaci signálu byla použita sekundární protilátka Anti-Mouse IgG – FITC nebo TRITC, která byla zředěna 50× v 0,5% BSA v 2/3 PBS. Po inkubaci 60 min byla sklíčka naposledy oplachovaná 5 × 5 min ve 2/3 PBS. Na závěr byla krycí sklíčka montována na podložní skla pomocí média Mowiol s přídavkem DAPI pro vizualizaci jader buněk.

6.9 IVF

Pro indukci ovulace byly většinou použity minimálně 2 samice *X. tropicalis*. Každé samici bylo injikováno 15 jednotek (U) hCG jeden den předem a 150 U v den provedení pokusu. Zhruba 4 – 5 hodin po druhé dávce hCG byly samice vykladeny opatrnou masáží břišní krajiny do Petriho misky s malým množstvím roztoku 1 × MMR s Gentamycinem a oocyty byly rozloženy do jedné vrstvy. Samec *X. tropicalis* byl usmrcen účinkem roztoku 0,4% MS-222 s následnou dekapitací. Varlata byla odebrána z břišní dutiny a homogenizována v 500 µl L-15 média (Leibovitz) s 10% FBS. Tato směs byla použita pro oplození připravených oocytů. Po navázání spermií na povrch oocytů (cca 2 min), byl do misky přidán roztok 0,05 × MMR. Za těchto podmínek došlo během 15 – 20 min k oplození a rotaci oplozených oocytů animálním pólem vzhůru. Oplozené oocyty byly poté přeneseny na 5 min do 2,2% roztoku cysteinu a následně byly 4 × promyty roztokem 0,05 × MMR. Následovala selekce kvalitních životaschopných embryí pod stereomikroskopem a jejich přenesení na Petriho misku potaženou agarózou do 0,05 × MMR s Gentamycinem. Embrya byla kultivována v závislosti na vývojovém stádiu použitém pro transplantační experimenty.

6.10 Transplantace TSC

Pro transplantační experimenty byla nejdříve připravena jednobuněčná suspenze TSCs (kapitola 6.4.2). Připravené buňky byly transplantovány do pulců *Xenopus tropicalis* vývojového stádia 41 (prvotní stádium pulce 2 dny po oplození). Vybraní pulci byli umístěni do Petriho misky potažené agarózou s 0,05 × MMR a narkotizováni několika kapkami 0,4% roztoku MS-222. Transplantace byla provedena mikroinjektorem, kdy 5 µl suspenze TSCs bylo připraveno na parafilm a nasáto do skleněné kapiláry. Objem injikované směsi byl upraven pomocí mikrometru objektivu stereomikroskopu tak, aby bylo aplikováno zhruba 1000 buněk do dorzálního peritonea jednoho pulce. Přeživší TSCs byly v narkotizovaných pulcích průběžně pozorovány fluorescenčním stereomikroskopem.

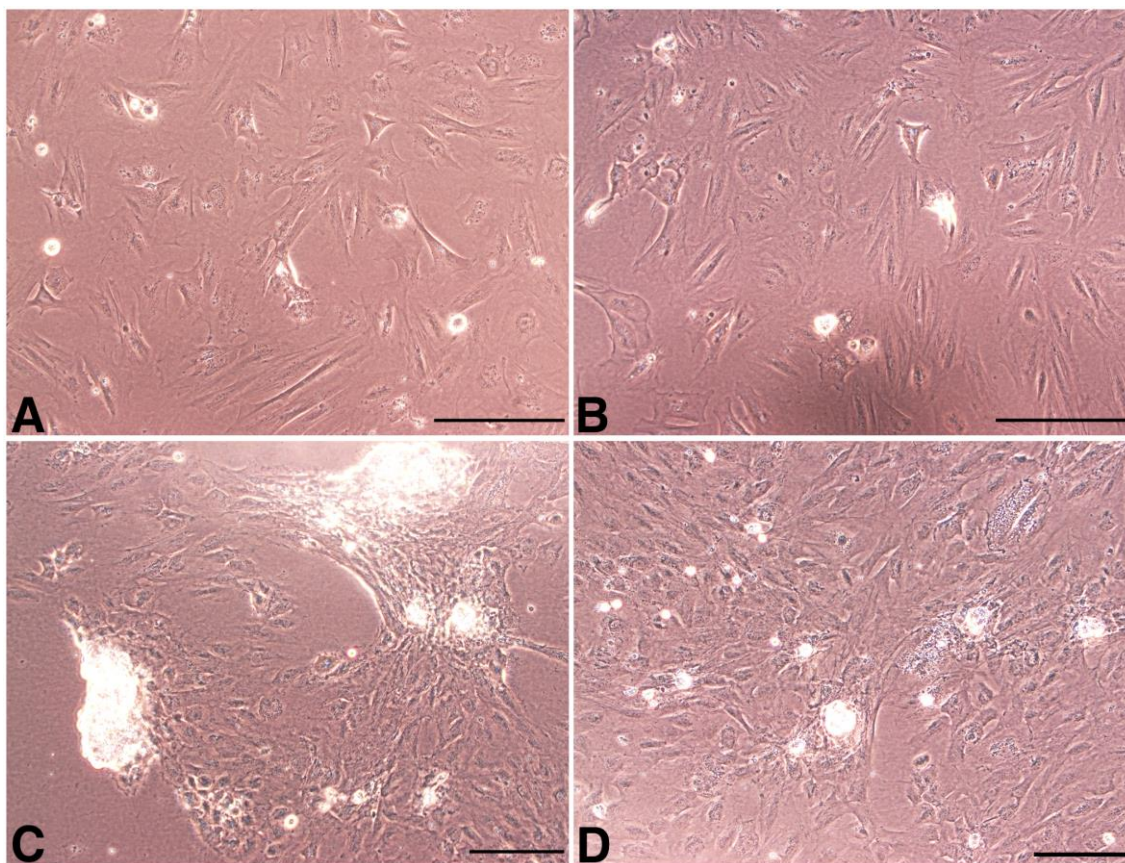
7 VÝSLEDKY

7.1 Charakterizace kultury TSCs

7.1.1 Efekt LIF na proliferační potenciál TSCs

V Laboratoři vývojové biologie PŘF UK byla poměrně dlouhou dobu buněčná kultura TSCs a pre-Sertoliho buněk kultivována v médiu, které se připravovalo smícháním kultivačního média s filtrovaným kondicionovaným médiem (médiem z již kultivovaných buněk) v poměru 1:1. Přidávání myšího LIF do kultivačního média se posléze ukázalo jako zásadní pro kultivaci TSCs *X. tropicalis*.

LIF je známý cytokin podporující proliferaci PGCs *in vitro* (Pesce et al., 1993) a stejným způsobem působí i na smíšenou kulturu *X. tropicalis*. TSCs kultivované v médiu s přidaným LIF jeví zvýšenou schopnost proliferace a rychleji formují charakteristické kolonie než při kultivaci v kondicionovaném médiu (Obr. 8A-C). Při kultivaci kultury v kondicionovaném médiu s přidavkem LIF byl sice pozorován nárůst TSCs i tvorba kolonií, ale zřejmě v důsledku kumulace odpadních metabolitů buněk k tomu docházelo pomaleji než v případě kultivace buněk v čerstvém médiu s LIF (Obr. 8D).



Obrázek 8 Formování kolonií TSCs *Xenopus tropicalis* po 14 dnech kultivace v různých médiích.
A: Kultivační médium bez LIF; **B:** ½ kultivační médium a ½ kondicionované médium; **C:** Kultivační médium s LIF; **D:** ½ kultivační médium s LIF a ½ kondicionované médium s LIF. Měřítka reprezentuje 100 μm .

7.1.2 RT-PCR

Na základě dostupné literatury byl navržen expresní profil, který měl sloužit pro přesnější charakterizaci TSCs a eventuálně určit stádium jejich diferenciaci. Metodou RT-PCR byla stanovena exprese genů charakteristických pro pluripotentní kmenové buňky (c-myc, klf4, oct25, oct60, oct91, sox2, tert), genů typických pro zárodečné buňky (dazl, ddx4, ddx25) a pro Sertoliho buňky (kitlg, lif, sox9) (Tabulka 4). Expresní analýza byla provedena z RNA izolované z celých varlat, z podpůrné vrstvy pre-Sertoliho buněk a z TSCs. Zároveň byl zjišťován vliv myšího LIF na expresní profil TSCs, které byly před izolací RNA kultivovány v médium s nebo bez LIF.

Gen	Genová exprese			
	varlata	pre-Sertoliho buňky	TSC LIF-	TSC LIF+
markery pluripotence				
c-myc				
klf4				
oct25 (oct4)				
oct60 (oct4)				
oct91 (oct4)				
sox2				
tert				
markery zárodečných buněk				
dazl				
ddx4 (vasa)				
ddx25				
markery Sertoliho buněk				
kitlg				
lif				
sox9				
provozní gen				
odc1				

Tabulka 4 Expresní profil zárodečných buněk izolovaných z varlat, TSC kultivovaných s a bez LIF a pre-Sertoliho buněk.

Analýza odhalila, že TSCs a pre-Sertoliho buňky se zásadně liší pouze v expresi pluripotentního genu oct25 a zajímavé je, že ani jedny neexprimují markery zárodečných buněk. Navíc jak TSCs, tak pre-Sertoliho buňky exprimují LIF, čímž vytváří pozitivní zpětnou vazbu a podporují vlastní proliferaci. Samotný LIF však nemá vliv na změny exprese, která je totožná u TSCs kultivovaných v médiu s LIF a TSCs kultivovaných v médiu bez LIF .

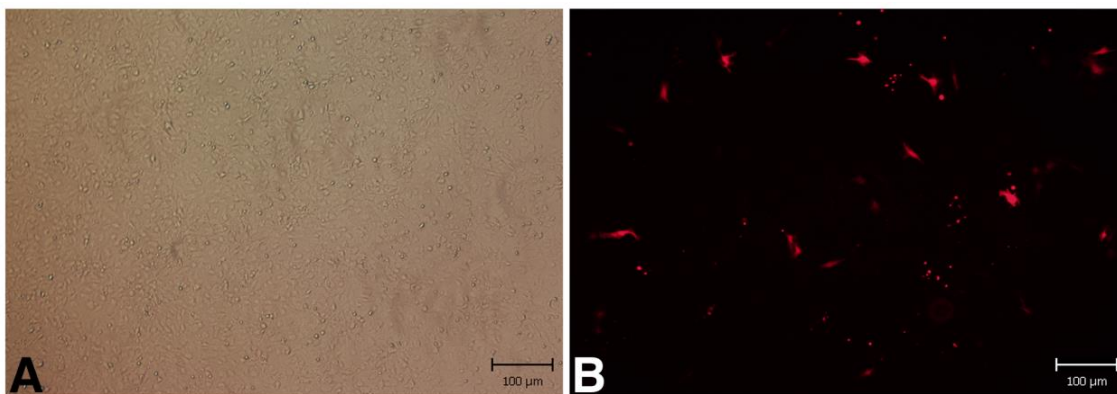
7.2 Transfekce

7.2.1 Lipofekce

Lipofekční reagentie se značně liší účinností transfekce, proto bylo vyzkoušeno více typů. TSCs byly transfekovány spolu s podpůrnou vrstvou pre-Sertoliho buněk a účinnost transfekce byla sledována pro oba typy buněk dohromady.

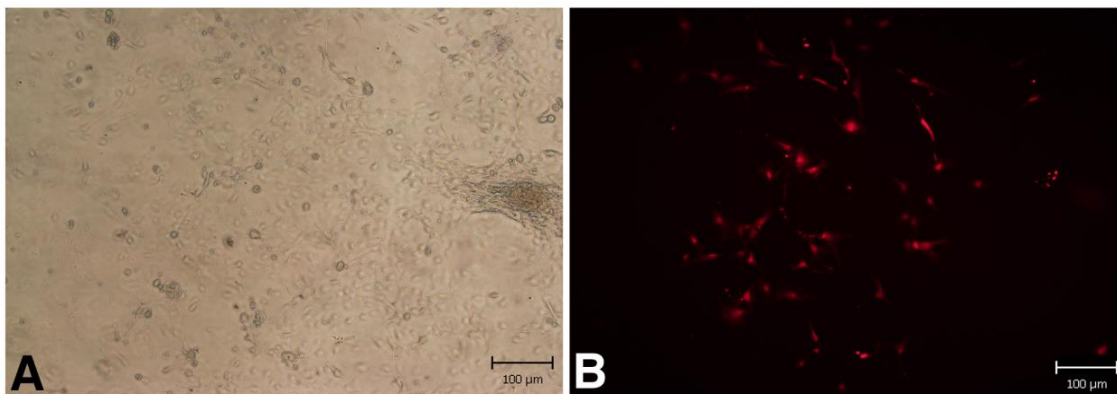
Transfekce Nanofectaminem a jetPEITM byla neúspěšná. Při použití Nanofectaminu podle doporučení výrobce byla úmrtnost den po transfekci přes 90 %. V případě jetPEITM byla úmrtnost zanedbatelná, nicméně úspěšnost transfekce dosahovala vždy méně než 0,1 %.

U dalších lipofekčních reagentií (LipofectamineTM, TransFectinTM, Viromer[®]) bylo po prvních pozitivních výsledcích optimalizováno množství použité reagentie, množství použité pDNA a doba působení transfekční směsi na buňky. Po transfekci byly buňky dále kultivovány standardním způsobem a byl sledován případný nárůst transfekovaných buněk. V případě LipofectaminuTM měla transfekce úspěšnost 2 % (Obr. 9), avšak po dvou dnech zůstalo transgenních pouze minimum buněk.



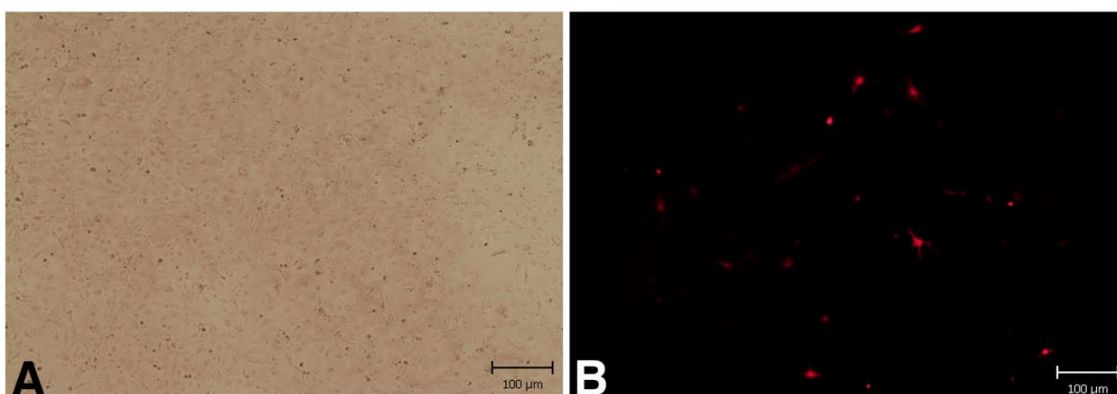
Obrázek 9 Transfekce TSCs *X. tropicalis* pomocí činidla LipofectaminTM. Druhý den po transfekci. A: procházející světlo; B: RFP fluorescenční signál. Měřítka reprezentuje 100 µm.

Nejúspěšnější z použitých lipofekčních činidel byl TransFectinTM, jímž se po týdnu kultivace podařilo získat 4% populaci pozitivních buněk (Obr. 10), nicméně v průběhu dalších 14 dnů počet pozitivních buněk rapidně klesal.



Obrázek 10 Transfekce TSCs *X. tropicalis* pomocí činidla TransFectin™. Týden po transfekci. A: procházející světlo; B: RFP fluorescenční signál. Měřítka reprezentuje 100 µm.

Pro transientní lipofekci buněk je zřejmě nejvhodnější reagent Viromer® RED, protože účinnost transfekce se za různých podmínek pohybovala vždy okolo 2 % (Obr. 11) a byla stabilní po dobu 7 – 14 dní.



Obrázek 11 Transfekce TSCs *X. tropicalis* pomocí Viromer® RED. Druhý den po transfekci. A: procházející světlo; B: RFP fluorescenční signál. Měřítka reprezentuje 100 µm.

Lipofekce zjevně není vhodnou metodou pro vytvoření stabilní transgenické kultury TSCs u *X. tropicalis*, proto bylo přistoupeno k dalším metodám.

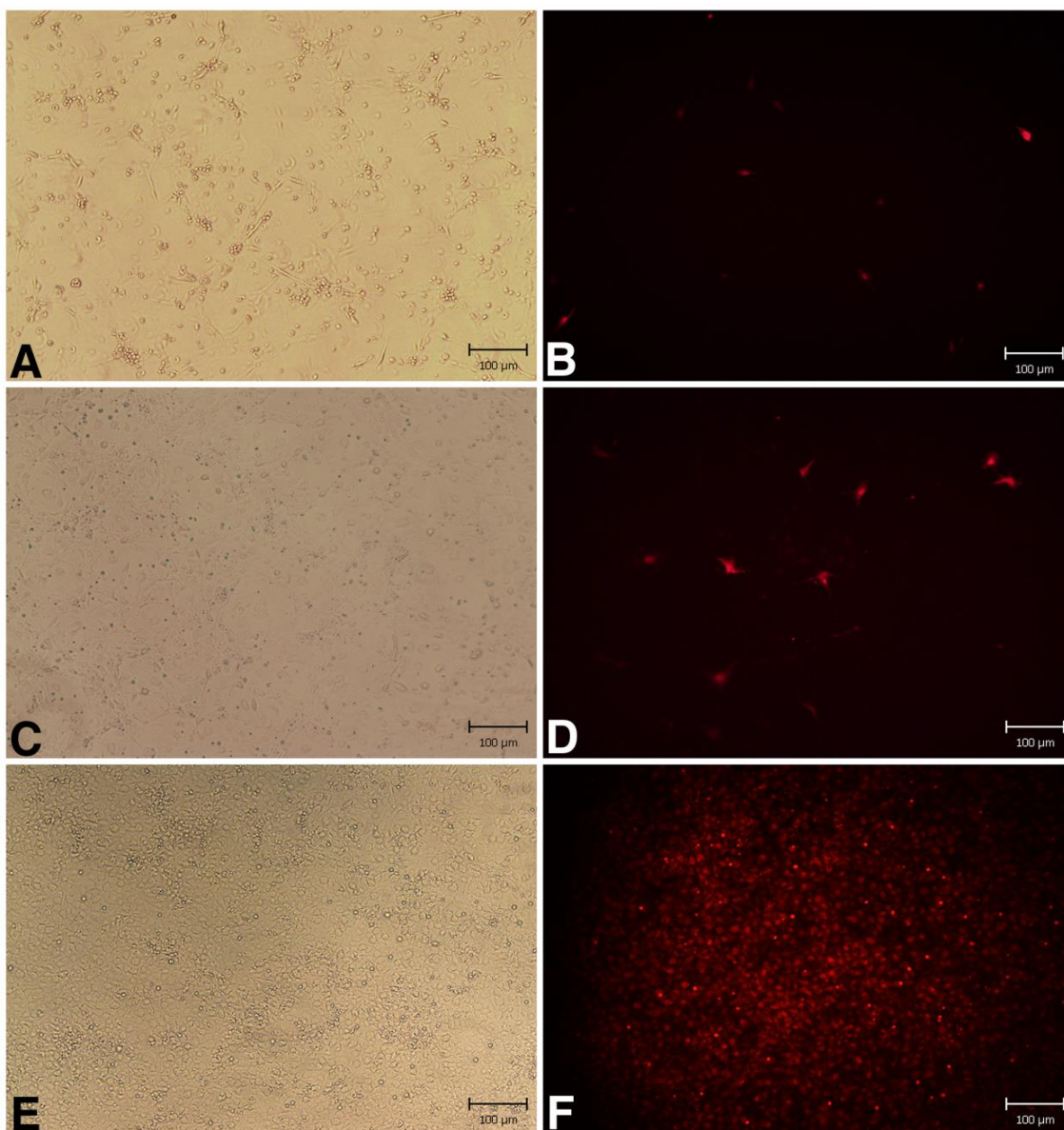
7.2.2 Kalcium fosfátová metoda

Kalcium fosfátová metoda transfekce buněk je relativně levná, nenáročná a často používaná metoda u různých druhů organismů. S úspěchem byla použita i u buněčných kultur druhu *X. tropicalis* (Gradl et al., 1999), nicméně pro TSCs se ukázala jako nevhodná. Úmrtnost buněk byla druhý den po transfekci okolo 80 %, zatímco účinnost transfekce byla téměř nulová.

7.2.3 Nukleofekce

Pro transfekci obtížně transfekovatelných typů buněk, jako jsou například kmenové buňky, a pro stabilní transfekci je doporučována metoda nukleofekce. Jedná se o technologii Amaxa® Nucleofector®, jejíž obchodní značku vlastní firma Lonza. Výrobce garantuje, že pomocí přístroje Nucleofector v kombinaci se speciálními sadami chemikálií určených pro různé typy buněk, bude přenášena DNA vnesena přímo do jádra buňky a dojde tak s vyšší pravděpodobností k její inkorporaci do genomu buňky. Kmenové buňky druhu *X. tropicalis* nepatří mezi buněčné linie, pro které je metoda nukleofekce optimalizovaná a neexistují doporučení pro vhodný elektroporační program či nukleofekční roztok. Z tohoto důvodu byly vyzkoušeny programy doporučené pro různé typy kmenových buněk či jiných, obtížně transfekovatelných buněk savců a jiných obratlovců (A-012, A-024, A-027, A-030, A-031, A-033, B-016, C-017, O-020, T-020, T-021, U-023). V rámci všech experimentů byl používán pouze jeden nukleofekční roztok, aby bylo možné srovnání úspěšnosti jednotlivých programů.

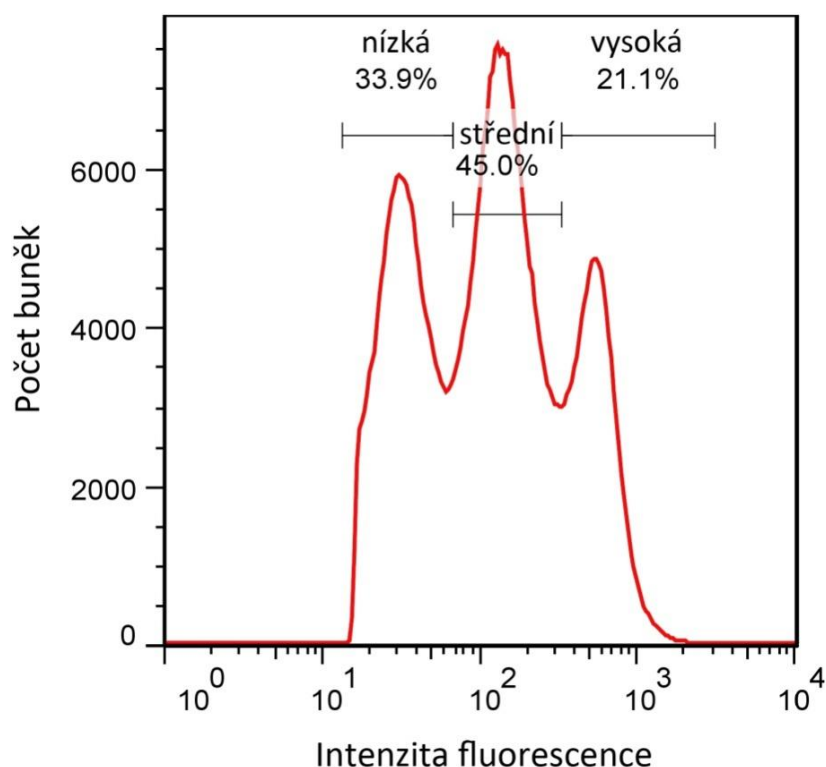
U poloviny vyzkoušených programů byla úspěšnost transfekce minimální až nulová. Programy s označením A-024, A-030, A-031, A-033 a T-020 se ukázaly jako nejúčinnější. Buňky byly dále kultivovány a sledoval se nárůst transgenních buněk v kultuře. Pomocí programu T-020 se nakonec podařilo připravit stabilní transgenní kulturu TSCs exprimující Katushka-RFP (Obr. 12). Po 105 dnech od transfekce byly pozitivní TSCs separovány od negativních buněk metodou FACS. Čistá a stabilní transgenní kultura TSCs *X. tropicalis* byla tedy získána použitím kombinace nejúčinnějších programů přístroje Nucleofector a následnou opakovanou separací transgenních buněk metodou FACS.



Obrázek 12 Transfekce TSCs *X. tropicalis* metodou nukleofekce. **A, B:** procházející světlo a RFP fluorescenční signál 2. den po nukleofekci; **C, D:** po týdnu; **E, F:** po měsíci. Měřítka reprezentuje 100 µm.

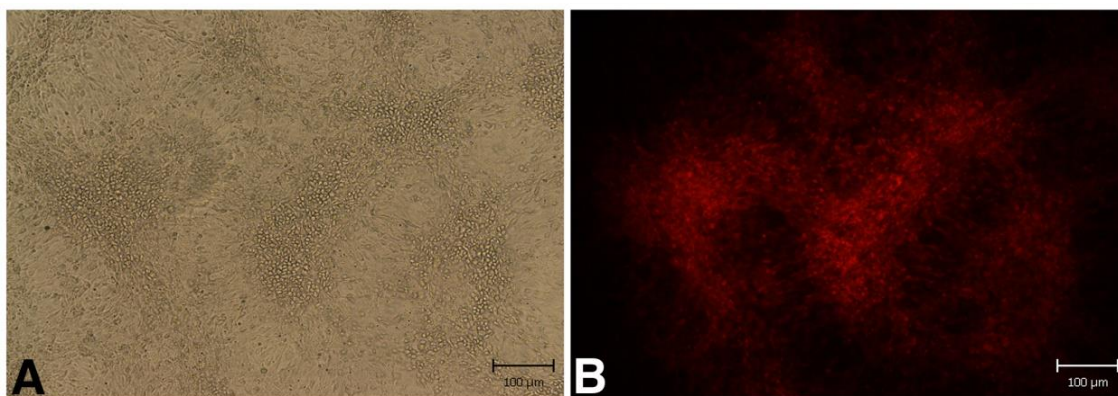
7.2.4 FACS

Transgenní buňky byly tříděny metodou FACS na základě jejich fluorescence. Podle intenzity fluorescence byly buňky v průběhu třídění rozděleny do tří skupin (Obr. 13). Nakonec byly zachovány a dále používány pouze buňky s nejvyšší intenzitou fluorescence.



Obrázek 13 Jednparametrový fluorescenční histogram buněk pozitivních na RFP. Osa x reprezentuje logaritmickou stupnici intenzity fluorescence a osa y počet buněk.

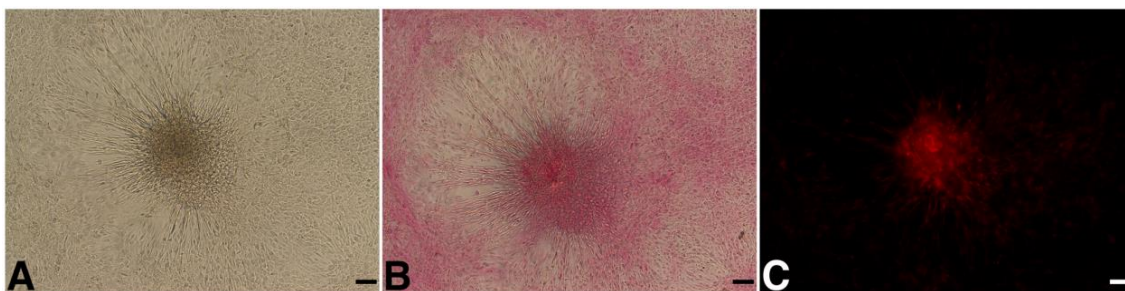
Je všeobecně známo, že transientně transfekované buňky mohou postupně ztrácet vnášenou vlastnost. Vzhledem k tomu, že proliferace negativních TSCs byla v porovnání s transgenními daleko rychlejší a negativní buňky vykazovaly vyšší viabilitu, docházelo k přerůstání transgenních buněk. Z tohoto důvodu byla separace opakována několikrát, dokud nebylo dosaženo transgenní buněčné kultury, kterou bylo možno pasážovat bez ztráty fluorescenčního signálu (Obr. 14).



Obrázek 14 Stablní transgenní kultura TSCs *X. tropicalis*. A: procházející světlo; B: RFP fluorescenční signál. Měřítka reprezentuje 100 µm.

7.3 Detekce alkalické fosfatázy

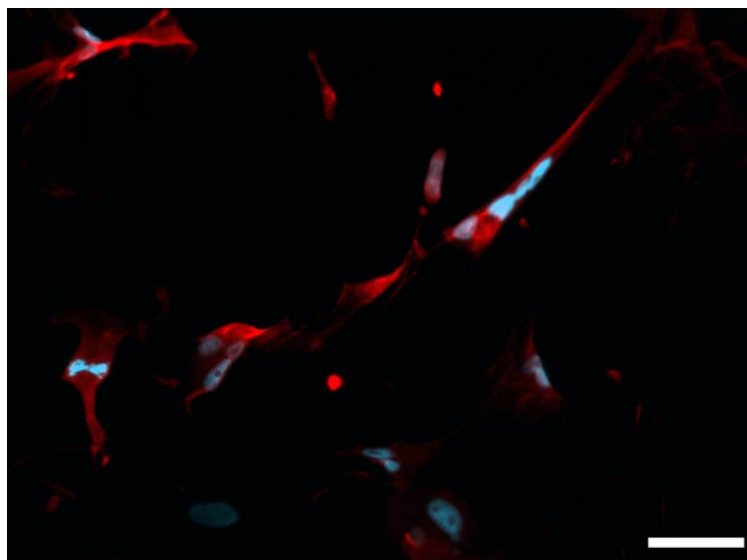
Získaná transgenní kultura TSCs byla histochemicky testována na přítomnost alkalické fosfatázy, která je jedním ze znaků kmenových buněk (Hahnel et al., 1990; MacGregor et al., 1995; Buehr, 1997). Reakce na přítomnost alkalické fosfatázy byla u transgenních buněk pozitivní (Obr. 15) a ukazuje, že procesem transgeneze nedošlo ke změně kmenovosti buněk.



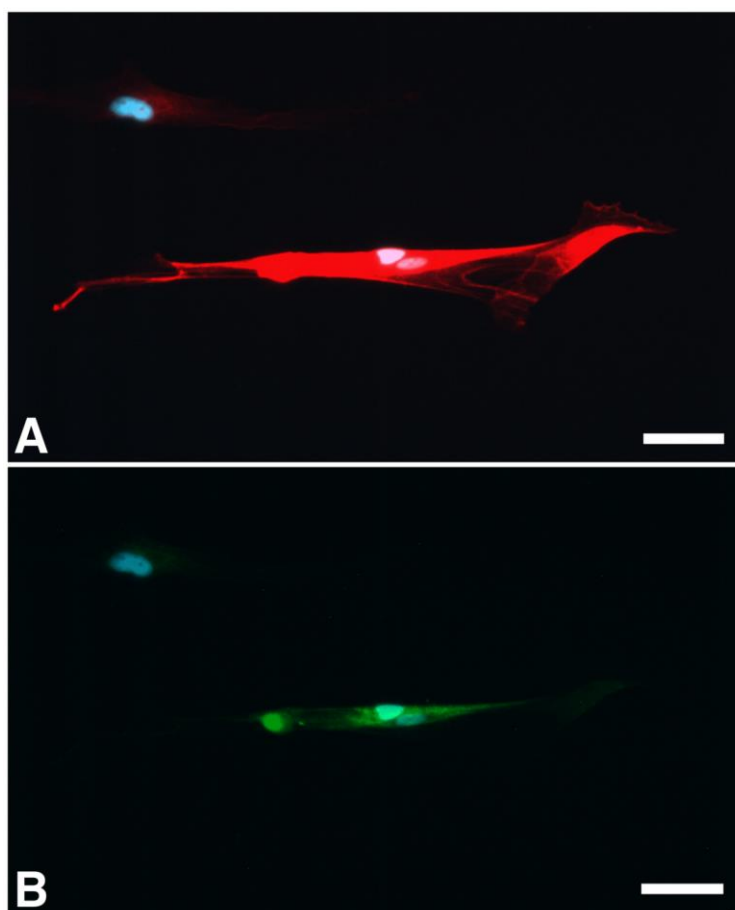
Obrázek 15 **Obrázek 16** Detekce alkalické fosfatázy u transgenní kultury TSCs *X. tropicalis*. **A:** procházející světlo; **B:** reakce na alkalickou fosfatázu; **C:** RFP fluorescenční signál. Měřítka reprezentuje 100 μm .

7.4 Metoda zavěšené kapky

Metoda zavěšené kapky se používá pro spontánní diferenciaci kmenových buněk v *in vitro* systému a je tedy způsobem, jak prokázat jejich diferenciační potenciál. Po kultivaci TSCs *X. tropicalis* v zavěšené kapce došlo ke zformování embryoidních tělísek, která byla dále kultivována na krycích sklíčkách potažených želatinou. Po adhezi embryoidních tělísek na sklíčka, začaly buňky postupně migrovat po celé ploše sklíčka. V této fázi vykazovaly některé buňky morfologii neuronů a to zejména na okrajích. Neurální charakter diferencovaných TSCs byl prokázán imunohistochemickým barvením protilátkou proti povrchovému markeru neurálních buněk (Obr. 16). Stejných výsledků bylo dosaženo i v případě transgenních buněk (Obr. 17).



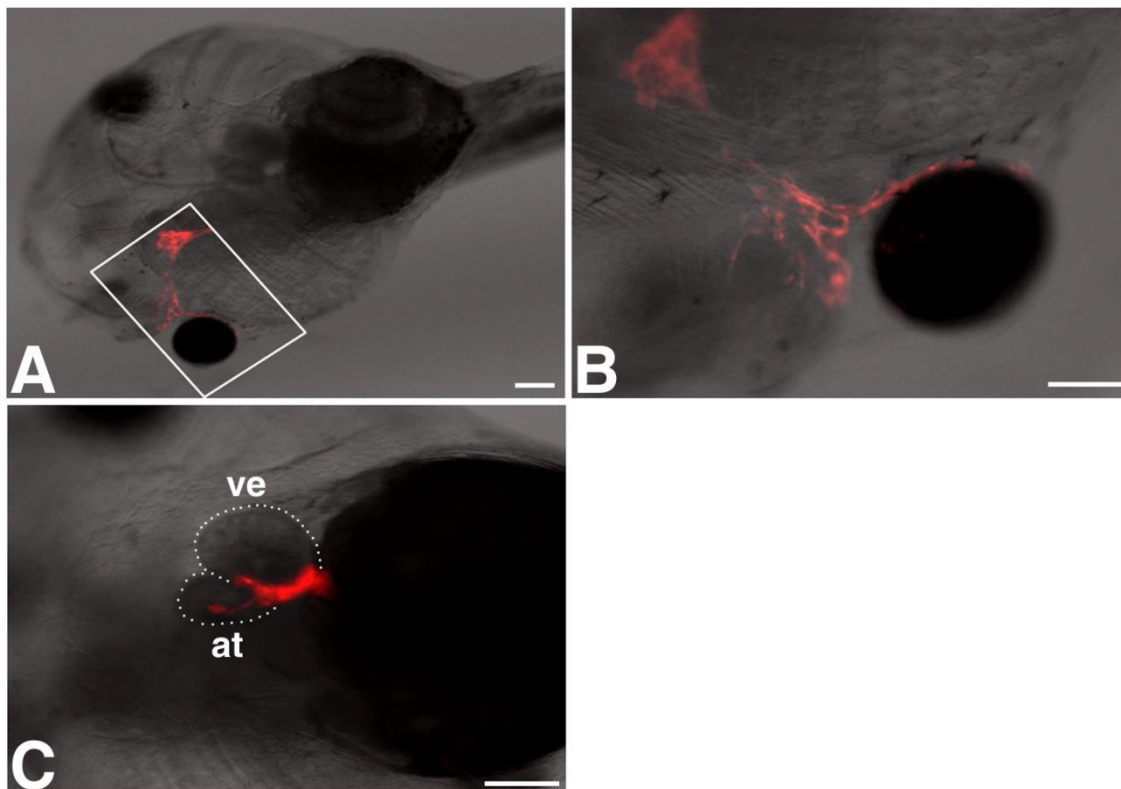
Obrázek 17 *In vitro* diferenciace TSCs *X. tropicalis* metodou zavěšené kapky. Červený signál - protilátka proti povrchovému markeru neurálních buněk; modře - DAPI. Signály byly snímány odděleně černobílou kamerou. Barvy byly dodány při skládání snímků v programu ACC. Měřítka reprezentuje 50 μm .



Obrázek 18 *In vitro* diferenciace transgenních TSCs *X. tropicalis* metodou zavěšené kapky. **A:** Katushka-RPF signál transgenních TSCs; modře - DAPI; **B:** zelený signál - protilátka proti povrchovému markeru neurálních buněk; modře - DAPI. Signály byly snímány odděleně černobílou kamerou. Barvy byly dodány při skládání snímků v programu ACC. Měřítka reprezentuje 10 μm .

7.5 Transplantace TSC

Transgenní TSCs byly transplantovány do dorzálního peritonea pulců (stádium 41) *X. tropicalis*. Pátý den po mikroinjekci byly Katushka-RFP pozitivní buňky přítomny u 72 % pulců. Tyto buňky pak v některých případech vytvořily v oblasti hlavy propojenou síť připomínající neurony (Obr. 18A-B), zatímco jiné transplantované buňky vytvořily shluky a migrovaly do oblasti srdce (Obr. 18C).



Obrázek 19 Pulec *X. tropicalis* (stádium 41) 5. den po transplantaci transgenních TSCs. **A:** migrace TSCs do oblasti hlavy; **B:** migrace TSCs do oblasti hlavy - detail; **C:** migrace TSCs do oblasti srdce. ve - srdeční komora (ventricle); at - srdeční síň (atrium). Signály byly snímány černobílou kamerou. Barvy byly dodány v programu ACC. Měřítka reprezentuje 200 μm .

8 DISKUZE

Kultura TSCs odvozená z varlat *Xenopus tropicalis* byla získána v předchozích letech dlouhodobou kultivací pre-Sertoliho buněk v Laboratoři vývojové biologie PŘF UK. Formování kolonií kmenových buněk bylo pozorováno v průběhu kultivace v kondicionovaném médiu, které mělo zároveň pozitivní vliv i na proliferaci buněk.

Kondicionované médium je kultivační médium obohacené o faktory a látky produkované podpůrnou vrstvou vyživovacích buněk - v tomto případě pre-Sertoliho buněk. Tyto faktory jsou nezbytné pro efektivní kultivaci TSCs, proto je podpůrná vyživovací vrstva pre-Sertoliho buněk nepostradatelnou součástí této kultury. Efektu kondicionovaného média je však možno docílit přidáním konkrétních růstových faktorů do kultivačního média (Xu et al., 2005).

Nejčastějším doplňkem médií pro kmenové buňky je kromě jiných i LIF, který zajišťuje jejich proliferaci, udržuje je v nediferencovaném stavu a v některých případech podporuje jejich přeměnu do pluripotentního stavu (shrnutí v Hiroyuki et al., 2011). V případě testikulárních kmenových buněk je dokonce nezbytným faktorem pro dlouhodobou kultivaci PGCs *in vitro* (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992), stejně jako pro dlouhodobou kultivaci SSCs (Kanatsu-Shinohara et al., 2003). Zároveň je součástí médií určených pro kultivaci testikulárních buněk, u kterých je indukována dediferenciace do pluripotentního stádia (Guan et al., 2006; Conrad et al., 2008). Optimalizace podmínek kultivace TSCs odvozených z *X. tropicalis* ukázala, že LIF je zásadním faktorem nezbytným pro podporu proliferace a iniciaci tvorby kolonií charakteristických pro různé typy kmenových buněk.

Kultivace TSCs v médiu s přidaným myším LIF byla jednoznačně nejefektivnějším způsobem kultivace těchto buněk, a to i ve srovnání s použitím kondicionovaného média. Zároveň bylo zjištěno, že dlouhodobá kultivace s LIF nemá vliv na změny exprese u TSCs. Buňky v médiu s LIF dlouhodobě prospívají a rychle proliferují, což bylo zásadní pro úspěch všech pokusů prováděných v rámci této diplomové práce. Zároveň se tím otvírá možnost experimentů s kultivací TSCs na jiných nosičích, což bylo dosud nemožné.

Kultivace kmenových buněk, a tedy i jejich závislost na LIF, je druhově specifická. U myši lze použitím LIF kultivovat ESCs bez vrstvy podpůrných buněk, zatímco pro lidské ESCs je LIF nedostačující (Skottman and Hovatta, 2006). Je proto zajímavé, že u buněk *X. tropicalis* bylo dosaženo pozitivních výsledků i při použití myšího LIF. To ukazuje na evoluční konzervovanost metabolických drah souvisejících s udržení kmenového charakteru. Vzájemná zastupitelnost těchto proteinů je logická s ohledem na jejich konzervovanou 3D strukturu (Mathieu et al., 2012).

Na základě analýzy exprese pomocí RT-PCR bylo odhaleno, že LIF je produkován v menší míře nejen podpůrnou vrstvou pre-Sertoliho buněk, ale zejména samotnými TSCs. Nárůstem TSCs způsobeným přidáním myšího LIF do média tedy dochází k vyšší produkci žabího LIF, čímž vzniká pozitivní zpětná vazba. Přestože se myší LIF ukázal být nutným pro prvotní vytvoření kolonií, vzniká otázka, zda-li zvýšená produkce LIF samotnými TSCs nebude v pozdějších fázích kultivace dostatečná a nezávislá na přidávaném myším LIF.

Bližší informace o charakteru TSCs se povedlo získat srovnáním expresí vybraných genů u kmenových buněk a pre-Sertoliho buněk. Metodou RT-PCR byla analyzována exprese genů typických pro zárodečné buňky, Sertoliho buňky a pro pluripotentní buňky. Z výsledků této analýzy vyplývá otázka o původu TSCs odvozených z *X. tropicalis*, u kterých překvapivě nedochází k expresi genů typických pro zárodečné buňky, proto je nepravděpodobné že by primární kultura TSCs pocházela z SSCs. Již dříve bylo u myši dokázáno, že SSCs si v kultuře zachovávají expresi genů charakteristických pro buňky zárodečné linie, a to i v případě dlouhodobých kultur a úspěšných pokusů o znovunabytí pluripotentního stavu u těchto buněk (Kanatsu-Shinohara et al., 2008). Na druhou stranu je expresní profil TSCs z *X. tropicalis* téměř totožný s profilem pre-Sertoliho buněk a lze tedy uvažovat o jejich společném původu. Liší se pouze v expresi genu *oct25*, který je jedním ze tří ortologů genu *oct4* savců včetně člověka. Bylo dokázáno, že exprese všech faktorů pluripotence, tzn. *oct4*, *klf4*, *c-myc* a *sox2*, je nezbytná a zároveň dostačující pro vznik indukovaných pluripotentních buněk u savců (Induced pluripotent stem cells; iPS cells) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Tato skutečnost naznačuje možný pluripotentní potenciál TSCs odvozených z varlat *X. tropicalis*.

V případě iPS buněk zůstávají geny typické pro výchozí buněčnou linii exprimovány i po dediferenciaci (Gupta et al., 2010; Polouliakh, 2013). Srovnání exprese iPS s původními buňkami tedy velmi připomíná výsledky analýzy RT-PCR u TSCs a pre-Sertoliho buněk z *X. tropicalis* zmíněné výše. Tato data odpovídají verzi, podle které TSCs pochází z pre-Sertoliho buněk, u kterých došlo k dediferenciaci spuštěním exprese dalšího z pluripotentních faktorů.

Podobná situace nastala u kultury eSCs, získané biopsií dospělých pacientů bez zárodečných kmenových buněk. Vzhledem k tomu, že by se teoreticky neměly eSCs u dospělých mužů vyskytovat, byla autory nabídnuta teorie, která předpokládá, že jejich kultura eSCs vznikla právě dediferenciací Sertoliho buněk v důsledku nepřítomnosti zárodečných buněk (Steger et al., 1999). Získání kultury nediferencovaných Sertoliho buněk se podařilo i v dalších případech izolací z dospělého jedince, kde by se teoreticky měly vyskytovat pouze terminálně diferencované neproliferující Sertoliho buňky (Tarulli et. al., 2006; Chui et. al., 2011). V dalším experimentu, kdy byly buňky izolovány z pacientů se syndromem SCO, byla též získána kultura kmenových buněk. Z tohoto důvodu lze usuzovat, že testikulární tkáň může být zdrojem kmenových buněk i jiného původu než z SSCs (Stimpfel et al., 2012).

Při kultivaci Sertoliho buněk v médiu s různými růstovými faktory a hormony se může měnit exprese genů pro inhibitory diferenciačních proteinů a tím lze u těchto buněk modifikovat např. schopnost proliferace (Chaudhary et al., 2005). Tyto studie naznačují jistou flexibilitu Sertoliho či pre-Sertoliho buněk ve schopnostech proliferace a diferenciace nebo dediferenciace *in vitro*. Mimoto je dediferenciace buněk u obojživelníků běžná součást regeneračních procesů (Brookes and Kumar, 2002). TSCs odvozené z *X. tropicalis* navíc společně s pre-Sertoliho buňkami produkují LIF, což je typické pro Sertoliho buňky, ale ne pro zárodečné buňky (Piquet-Pellorce et al., 2000).

Dalším způsobem charakterizace TSCs je studium jejich migrace a diferenciace. Migrační potenciál TSCs *X. tropicalis* byl v Laboratoři vývojové biologie do této doby studován pomocí jejich značení vitální fluorescenční barvičkou PKH26 a mikroinjekcí do blastul nebo peritonea pulců téhož druhu. Tento způsob však

neumožňuje dlouhodobé sledování TSCs, protože fluorescence postupně vymizí. Z tohoto důvodu bylo třeba vytvořit stabilní transgenní kulturu těchto buněk.

Efektivní metoda transfekce je cenný nástroj pro studium buněčných kultur. Měřítkem účinnosti transfekce je procento úspěšně transfekovaných buněk, které je závislé na mnoha proměnných faktorech (buněčný cyklus, genová exprese, místo inkorporace plazmidu), které mohou inhibovat expresi vnášeného genu. Pro vytvoření stabilní transgenní kultury *X. tropicalis* byl použit plazmidový vektor ISpBSIISK-CAG-Katushka. Stabilní a silná exprese genů pod kontrolou CAG promotoru je přítomna ve všech tkáních, včetně embryonálních stádií a zároveň je vhodný pro transfekci u obojživelníků (Sakamaki et al., 2005). Katushka-RFP je červený fluorescenční protein, jehož výhodou je stabilnější exprese a nižší toxicita v porovnání s jinými fluorescenčními proteiny (Shcherbo et al., 2007).

Ačkoliv existuje mnoho způsobů transfekce, jejich účinnost nebyla dosud u buněčné kultury *X. tropicalis* intenzivně studována. Kmenové buňky navíc patří mezi obtížně transfekovatelné typy buněk, proto byl výběr vhodné metody transfekce klíčový. Kalcium fosfátová metoda byla jednou z úspěšně vyzkoušených metod transfekce u buněčných kultur *X. tropicalis* (Gradl et al., 1999). V rámci mých experimentů se ale ukázala jako zcela nevhodná pro kmenové buňky vzhledem k jejich vysoké úmrtnosti. Další testovanou metodou byla lipofekce. Vzhledem k tomu, že se konkrétní lipofekční činidla liší jak toxicitou, tak složením lipozómů a tedy i úspěšností, bylo jich vyzkoušeno hned několik. Přestože se optimalizací postupů povedlo získat kulturu pozitivní ze 4 % (TransFectin™), žádným použitým lipofekčním činidlem (Nanofectamin, jetPEI™, Lipofectamine™, TransFectin™, Viromer®) nebylo dosaženo stabilní transfekce.

Stabilní transgenní kulturu TSCs *X. tropicalis* se nakonec podařilo získat použitím metody nukleofekce. V současné době je nukleofekce široce používaná nevirová metoda ve výzkumu kmenových buněk (Siemen et al., 2005; Aluigi et al., 2006). Hlavní výhodou této metody je, že vektory jsou vneseny přímo do jádra buňky a ke stabilní transfekci tedy dochází s vyšší pravděpodobností. Protože se v podstatě jedná o elektroporaci optimalizovanou na konkrétní buněčné linie, je klíčovým krokem použití vhodného programu a nukleofekčního roztoku. Pozitivního výsledku u TSCs *X. tropicalis* bylo dosaženo kombinací programů doporučených pro

kmenové buňky s navazující opakovanou separací pozitivních buněk metodou FACS. Přestože se kmenové buňky řadí mezi ty obtížně transfekovatelné, je jejich výhodou, že nedochází k senescenci buněk v důsledku tzv. Hayflickova limitu, který udává maximální počet buněčných dělení u somatické buňky (Hayflick and Moorhead, 1961). Díky dlouhodobé kultivaci transgenních buněk a jejich opakované selekci pomocí FACS byly z kultury odstraněny transientně transfekované buňky.

Transgenní kultura TSCs je novým nástrojem pro studium migračního a diferenciačního potenciálu těchto buněk. Po transplantaci transgenních TSCs do blastul by mohlo dojít ke vzniku chimérních jedinců a v případě pluripotence TSCs i následnému vývoji transgenních potomků. Jde tedy o nový potenciační způsob přípravy knock-out či jiných transgenních jedinců, což je technologie, která je u *X. tropicalis* zatím nedostupná.

Dosavadní výsledky migračních studií TSCs *X. tropicalis* ukázaly, že mikroinjekce TSCs do blastuly nebo peritoneální dutiny pulce vývojového stádia 41 vede k jejich migraci do struktur všech tří zárodečných listů: střeva, srdce, pronefros, epidermis, nervové soustavy a genitální rýhy (Fuxová, 2013). Takový výsledek indikuje pluripotentní potenciál TSCs. Toto tvrzení je také v souladu s výše zmíněnou expresí genů charakteristických pro pluripotentní buňky. V rámci této diplomové práce byla pro jeho další podporu provedena diferenciace *in vitro*. K indukci diferenciace kmenových buněk *in vitro* se již několik let používá metoda zavěšené kapky (Banerjee and Bhonde, 2006). Po optimalizaci postupů docházelo u TSCs *X. tropicalis* k diferenciaci do buněk neurálního charakteru spontánně, čili bez použití diferenciačních médií. Neurální charakter diferencovaných buněk byl poté potvrzen pomocí protilátky proti povrchovému proteinu neurálních buněk. Stejného výsledku pak bylo dosaženo i při použití transgenní kultury TSCs a je tedy zřejmé, že diferenciační potenciál nebyl po transgenezi u TSCs nijak omezen. V budoucnu bude nutné rozšířit postup metody zavěšené kapky o působení různých diferenciačních médií na TSCs, aby bylo dosaženo diferenciace *in vitro* i do dalších buněčných typů.

Pilotní transplantační experimenty transgenních TSCs byly provedeny mikroinjekcí TSCs do dorzálního peritonea pulců stádia 41 (Fuxová, 2013). Předběžné výsledky kopírují průběh experimentů s vitálně značenými TSCs

a naznačují tak, že si transgenní TSCs zachovávají i schopnost rozsáhlé migrace. V současné chvíli jsou recipientní pulci v chovech PřF UK. Po dokončení metamorfózy u těchto jedinců je v plánu příprava histologických preparátů, které by měly odhalit případnou přítomnost transgenních TSCs v jejich těle.

9 ZÁVĚR

- Bylo dokázáno, že složení kultivačního média a efekt LIF je zásadní pro proliferaci a prvotní tvorbu kolonií TSCs v kultuře *Xenopus tropicalis*.
- Na základě analýzy expresního profilu metodou RT-PCR byla ověřena exprese vybraných genů u TSCs a zároveň byl odhalen jejich společný původ s pre-Sertoliho buňkami.
- Podařilo se optimalizovat metodu transfekce pro buňky zkoumané kultury *X. tropicalis*.
- Byla připravena stabilní transgenní linie TSCs *X. tropicalis* exprimující Katushka-RFP.
- Metodou zavěšené kapky bylo docíleno spontánní diferenciaci transgenních i netrasgenních TSCs *X. tropicalis* do buněk neurálního charakteru.
- Transgenní TSCs byly použity pro allogenní transplantaci do peritonea pulců ve stádiu 41. Byla pozorována jejich migrace zejména do oblasti srdce a hlavy, kde vytvořily seskupení připomínající neurony.

10 SEZNAM LITERATURY

Ahmed EA, Barten-van Rijbroek AD, Kal HB, Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Pelt AM, de Rooij DG. (2009) Proliferative activity *in vitro* and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biology of reproduction* 80: 1084-1091.

Aluigi M, Fogli M, Curti A, Isidori A, Gruppioni E, Chiodoni C, Colombo MP, Versura P, D'Errico-Grigioni A, Ferri E, Baccarani M, Lemoli RM. (2006) Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:454–461.

Banerjee M, Bhonde RR. (2006) Application of hanging drop technique for stem cell differentiation and cytotoxicity studies. *Cytotechnology* 51: 1-5.

Beck CW, Slack JM. (2001) An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome Biology* 2: 1029.

Becker C, Jakse G. (2007) Stem cells for regeneration of urological structures. *European urology* 51: 1217-1228.

Brinster RL, Zimmermann JW. (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 11298-11302.

Brookes JP, Kumar A. (2002) Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 566-574.

Buehr M. (1997) The primordial germ cells of mammals: some current perspectives. *Experimental Cell Research* 232: 194-207.

Buganim Y, Itskovich E, Hu YC, Cheng AW, Ganz K, Sarkar S, Fu D, Welstead GG, Page DC, Jaenisch R. (2012) Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 11: 373-386.

Cannatella DC, de Sa RO. (1993) *Xenopus laevis* as a model organism. *Systematic Biology* 42: 476-507.

Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. (1996) Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 381: 418-421.

Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert KD, Stenzl A, Skutella T. (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456: 344-349.

Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Müller D. (2004) Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *The Journal of cell biology* 167: 935-944.

De Felici M, Farini D, Dolci S. (2009) In or Out Stemness: Comparing Growth Factor Signalling in Mouse Embryonic Stem Cells and Primordial Germ Cells. *Current Stem Cell Research and Therapy* 4: 87-97.

Donovan PJ, de Miguel MP. (2003) Turning germ cells into stem cells. *Current opinion in genetics & development* 13: 463-471.

Dym M, Fawcett DW. (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of reproduction* 3: 308-326.

Ensembl: Genome databases for vertebrates and other eukaryotic species.
<http://www.ensembl.org/index.html>.

Evans BJ, Kelley DB, Tinsley RC, Melnick DJ, Cannatella DC. (2004) A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 197-213.

Fuxová H. (2013) Studium migračního potenciálu testikulárních kmenových buněk u *Xenopus tropicalis*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Papadopoulos V, Zirkin BR, Hardy MP. (2006) In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2719-2724.

Gomperts M, Garcíacastro M, Wylie C, Heasman J. (1994) Interactions between primordial germ-cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120: 135-141.

Gonzalez R, Griparic L, Vargas V, Burgee K, Santacruz P, Anderson R, Schiewe M, Silva F, Patel A. (2009) A putative mesenchymal stem cells population isolated from adult human testes. *Biochemical and biophysical research communications* 385: 570-575.

Goossens E, Tournaye H. (2006) Testicular stem cells. *Seminars in reproductive medicine* 24: 370-378.

Gradl D, Köhl M, Wedlich D. (1999) The Wnt/Wg Signal Transducer β -Catenin Controls Fibronectin Expression. *Molecular and Cellular Biology* 19:5576-5587.

Grammer TC, Khokha MK, Lane MA, Lam K, Harland RM. (2005) Identification of mutants in inbred *Xenopus tropicalis*. *Mechanisms of development* 122: 263-272.

Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G. (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440: 1199-1203.

Gupta MK, Illich DJ, Gaarz A, Matzkies M, Nguemo F, Pfannkuche K, Liang H, Classen S, Reppel M, Schultze JL, Hescheler J, Sarić T. (2010) Global transcriptional profiles of beating clusters derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are highly similar. *BMC Developmental Biology* 10: 98.

Hahnel AC, Rappolee DA, Millan JL, Manes T, Ziomek CA, Theodosiou NG, Werb Z, Pedersen RA, Schultz GA. (1990) Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo. *Development* 110: 555-564.

Hayflick L, Moorhead PS. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25:585-621.

Hess RA, França LR. (2005). Structure of the Sertoli cell. *Sertoli cell biology* 19-40.

Hiroiyuki H, Peter K, Nobuaki K. (2011) Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochemical Journal* 438: 11-23.

Hofmann MC, Van Der Wee KS, Dargart JL, Dirami G, Dettin L, Dym M. (2003) Establishment and characterization of neonatal mouse sertoli cell lines. *Journal of Andrology* 24: 120-130.

Huckins C. (1971) The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *The Anatomical Record* 169: 533-557.*

Chaudhary J, Sadler-Riggelman I, Ague JM, Skinner MK. (2005) The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate. *Biology of reproduction* 72: 1205-1217.

Chui K, Trivedi A, Cheng CY, Cherbavaz DB, Dazin PF, Huynh AL, Mitchell JB, Rabinovich GA, Noble-Haeusslein LJ, John CM. (2011) Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells. *Cell Transplantation* 20: 619-635.

Chuma S, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Hosokawa M, Nakatsuji N, Ogura A, Shinohara T. (2005) Spermatogenesis from epiblast and primordial germ cells following transplantation into postnatal mouse testis. *Development* 132: 117-122.

Johnston DS, Wright WW, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, Jelinsky SA. (2008) Stage-specific gene expression is a fundamental characteristic of rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 8315-8320.

Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction* 69: 612–616.

Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. (2004) Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119: 1001-1012.

Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. (2005) Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biology of Reproduction* 72:985-91.

Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. (2006) The germ of pluripotency. *Nature biotechnology* 24: 663-664.

Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Miki H, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. (2006) Anchorage-independent growth of mouse male germline stem cells *in vitro*. *Biology of Reproduction* 74:522-29.

Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Yoshida S, Toyokuni S, Lee J, Ogura A, Shinohara T. (2007) Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture. *Biology of Reproduction* 76:55-62.

Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ikawa M, Nakamura T, Ogura A, Shinohara T. (2008) Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biology of reproduction* 78: 681-687.

Kanatsu-Shinohara, M., Shinohara, T. (2013) Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29: 163-187.

Kamimura M, Ikenishi K, Kotani M, Matsuno T. (1976) Observations on the migration and proliferation of gonocytes in *Xenopus laevis*. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 36: 197-207.

Kashiwagi K, Kashiwagi A, Kurabayashi A, Hanada H, Nakajima K, Okada M, Takase M, Yaoita Y. (2010) *Xenopus tropicalis*: an ideal experimental animal in amphibia. *Experimental animals* 59: 395-405.

Kaur G, Thompson LA, Dufour JM. (2014) Sertoli cells—Immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* 30: 36-44.

Kloc M, Dougherty MT, Bilinski S, Chan AP, Brey E, King ML, Patrick CWJr, Etkin LD. (2002) Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Developmental Biology* 241: 79-93.

Ko K, Tapia N, Wu G, Kim JB, Bravo MJA, Sasse P, Glaser T, Ruau D, Han DW, Greber B, Hausdörfer K, Sebastiano V, Stehling M, Fleischmann BK, Brüstle O, Zenke M, Schöler HR. (2009) Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell* 5: 87-96.

Liu CF, Barsoum I, Gupta R, Hofmann MC, Yao HHC. (2009) Stem cell potential of the mammalian gonad. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 1: 510-518.

Lo KC, Lei Z, Rao CV, Beck J, Lamb DJ. (2004) De novo testosterone production in luteinizing hormone receptor knockout mice after transplantation of leydig stem cells. *Endocrinology* 145: 4011-4015.

MacGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P. (1995) Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* 121: 1487-1496.

Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology* 59: 1-13.

Mather JP. (1980) Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines. *Biology of Reproduction* 23: 243-252.

Mathieu ME, Saucourt C, Mournetas V, Gauthereau X, Thézé N, Praloran V, Thiébaud P, Bœuf H. (2012) LIF-dependent signaling: new pieces in the Lego. *Stem Cell Reviews* 8: 1-15.

Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70: 841-847.

McBurney MW. (1993) P19 embryonal carcinoma cells. *The International journal of developmental biology* 37: 135-140.

McLaren A. (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology* 262: 1-15.

Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. (2009) A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice. *Cell* 137: 571-584.

Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. (1988) Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122:787-794.

Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M. (1993) Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 118: 1089-1094.

Piquet-Pellorce C, Dorval-Coiffec I, Pham MD, Jégou B. (2000) Leukemia inhibitory factor expression and regulation within the testis. *Endocrinology* 141: 1136-1141.

Polouliakh N. (2013) Reprogramming resistant genes: in-depth comparison of gene expressions among iPS, ES, and somatic cells. *Front Physiol* 4: 7.

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. (1992) Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359: 550 - 551.

Ressom RE, Dixon KE. (1988) Relocation and reorganization of germ plasm in *Xenopus* embryos after fertilization. *Development* 103: 507-518.

Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R. (2000) Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *Journal of endocrinological investigation* 23: 609-615.

Russell LD, França LR, Brinster RL. (1996a) Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *Journal of andrology* 17: 603-614.

Russell LD, Brinster RL (1996b) Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *Journal of andrology* 17: 615-627.

Sakamaki K, Takagi C, Yoshino J, Yokota H, Nakamura S, Kominami K, Hyodo A, Takamune K, Yuge M, Ueno N. (2005) Transgenic frogs expressing the highly fluorescent protein venus under the control of a strong mammalian promoter suitable for monitoring living cells. *Developmental dynamics* 233: 562-569.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. (2003) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125: 769-784.

Sheng C, Zheng Q, Wu J, Xu Z, Wang L, Li W, Zhang H, Zhao XY, Liu L, Wang Z, Guo Ch, Wu HJ, Liu Z, Wang L, He S, Wang XJ, Chen Z, Zhou Q. (2011) Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors. *Cell research* 22: 208-218.

Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, Solovieva EA, Lukyanov KA, Bogdanova EA, Zaraisky AG, Lukyanov S, Chudakov DM. (2007) Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nature methods* 4: 741-746.

Siemen H, Nix M, Endl E, Koch P, Itskovitz-Eldor J, Brustle O. (2005) Nucleofection of human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development* 14:378–383.

Skottman H, Hovatta O. (2006) Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction* 132: 691-698.

Steger K, Rey R, Louis F, Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E, Hoepffner W, Bailey D, Marks A, Bergmann, M. (1999) Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Human Reproduction* 14: 136-143.

Stimpfel M, Skutella T, Kubista M, Malicev E, Conrad S, Virant-Klun I. (2012) Potential stemness of frozen-thawed testicular biopsies without sperm in infertile men included into the *in vitro* fertilization programme. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 291038.

Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.

Tam PPL, Snow MHL. (1981) Proliferation and migration of primordial germ-cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 64: 133-147.

Tarulli GA, Stanton PG, Lerchl A, Meachem SJ. (2006) Adult Sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: effect of FSH on proliferation and junction protein organization. *Biology of reproduction* 74: 798-806.

Thiebaud CH, Fischberg M. (1977) DNA content in the genus *Xenopus*. *Chromosoma* 59: 253-257.

Xenbase: *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* biology and genomics resource. <http://www.xenbase.org/entry/>.

Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, O'Sullivan C, Delavan-Boorsma K, Mok M, Bronstein A, Carpenter MK. (2005) Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem cells* 23: 315-323.

Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. (2000) Requirement of BMP8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Molecular Endocrinology* 14: 1053-1063.

Yoshimizu T, Obinata M, Matsui Y. (2001) Stage-specific tissue and cell interactions play key roles in mouse germ cell specification. *Development* 128: 481-490.

* Originální citace převzatá ze sekundárního zdroje.